



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

I Z T A C A L A

**ASOCIACION DE PROTEINA DE POLIOVIRUS AL PROMOTOR
TARDIO DE ADENOVIRUS-2 COMO UN POSIBLE MECANISMO
DE LA INHIBICION DE SU TRANSCRIPCION "IN VITRO"**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIATURA EN LA CARRERA DE**

B I O L O G I A

P R E S E N T A

ELIZABETH FRANCO MARTINEZ

SAN JUAN IZTACALA, EDO. DE MEXICO

1992

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional en el laboratorio y bajo la dirección del Dr. Carlos Fernández Tomás.

A mis padres,
José Luis y Josefina
con profundo cariño y
agradecimiento.

A Angélica, Bety, Miguel y Pepe,
por las innumerables
experiencias compartidas.

A G R A D E C I M I E N T O S

Al Dr. Carlos Fernández Tomás por la oportunidad brindada y la dirección de ésta tesis.

A los profesores de Iztacala, María Eugenia Heres, Sergio Vaca, Ignacio Peñaloza y Ramón Víctor Moreno, por la revisión del manuscrito.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Cía. Avon Cosmetics, S.A. de C.V., por la beca otorgada.

A todas aquéllas personas que de una forma u otra colaboraron en la realización de éste trabajo.

I N D I C E

	Página
Resumen.....	i
Lista de Figuras.....	iii

INTRODUCCION

Virus de la poliomielitis.....	1
Estructura.....	3
Genoma.....	4
Replicación viral intracelular.....	5
Adsorción, desencapsidación y penetración.....	5
Síntesis de proteína viral.....	6
Replicación del RNA viral.....	9
Ensamblaje y liberación de los virus.....	12
Alteración de las funciones del hospedero.....	15
Inhibición de la síntesis de proteína celular.....	15
Inhibición de la síntesis de DNA celular.....	19
Inhibición de la síntesis de RNA celular.....	20
Objetivos.....	28

MATERIALES Y METODOS

Origen de los materiales.....	29
Material biológico.....	29
Reactivos.....	30

Composición y preparación de las soluciones.....	32
Aislamiento del plásmido pLAX por medio de gradientes de CsCl	38
Aislamiento del plásmido pLAX por medio de sepharosa 4B.....	40
Determinación de la pureza del DNA aislado.....	42
Cuantificación del DNA aislado.....	42
Detección del DNA por medio de placas de agarosa	43
Restricción del plásmido pLAX con las enzimas AvaI y Bam HI.....	43
Análisis de los fragmentos de restricción en minigel de agarosa.....	44
Separación de los fragmentos de restricción en gradientes lineales de sacarosa de 5 a 20%.....	45
Separación de los fragmentos de restricción en gradientes lineales de sacarosa de 10 a 50%.....	46
Cultivo de células HeLa en suspensión.....	47
Infección de células HeLa con el virus de la poliomielitis.....	48
Marcaje de células HeLa con Metionina ³⁵ S durante la infección con el virus de la poliomielitis.....	49
Monitoreo de la síntesis de proteína en células HeLa durante la infección con el virus de la poliomielitis.	49
Obtención de extractos citoplasmáticos.....	50
Análisis de mezclas de transcripción "in vitro" en gradientes lineales de sacarosa.....	51
Determinación de la concentración de proteína.....	53

Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	53
Fluorografía.....	54

RESULTADOS

Obtención del DNA.....	55
Caracterización del DNA.....	57
Separación de los fragmentos de restricción en gradientes lineales de sacarosa.....	58
Infección de células HeLa con el virus de la poliomielitis.....	59
Obtención de extractos citoplasmáticos	60
Caracterización de los extractos citoplasmáticos	60
Análisis en gradientes lineales de sacarosa de de mezclas de transcripción "in vitro".....	62

DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	67
-------------------------------	----

REFERENCIAS.....	76
------------------	----

R E S U M E N

La infección de células de mamífero con Poliovirus o cualquier otro Picornavirus ocasiona una rápida inhibición de la transcripción de la célula hospedera, afectando principalmente la síntesis de RNA dependiente de la RNA polimerasa II.

De acuerdo a los datos reportados hasta ahora, puede decirse que muy probablemente, el virus ejerce su acción inhibitoria a nivel de la iniciación de la síntesis de cadenas de RNA; ya que se requiere de la síntesis y acumulación de productos virales para que ocurra la inhibición, se sugiere que la actividad inhibitoria es alguna proteína viral. Se ha demostrado que en el extracto citoplasmático proveniente de células HeLa infectadas con Poliovirus, se encuentra presente una actividad que induce la inhibición de la transcripción "in vitro" a partir del promotor tardío de Adenovirus-2; se ha sugerido que esta actividad, presumiblemente proteína viral, ejerce su efecto a nivel del DNA y sobre la iniciación específica de la transcripción.

En base a lo anterior, se planteó como objetivo, determinar si hay asociación de proteína de Poliovirus al promotor tardío de Adenovirus-2 (PMT-2), cuando éste se incubaba en condiciones de transcripción "in vitro", con un extracto citoplasmático infectado.

Para ello, se analizó mediante gradientes lineales de sacarosa, la posible formación de complejos DNA-proteína, después de incubar en condiciones de transcripción "in vitro", DNA (fragmentos de 1568 p.b. conteniendo el promotor tardío de Adenovirus-2) con extracto citoplasmático infectado marcado con Metionina^{35S}.

Bajo las condiciones antes mencionadas, todos los experimentos realizados sugieren la asociación de proteína-Metionina^{35S} a los templados de DNA. En todos los gradientes donde se analizaron mezclas de DNA-extracto citoplasmático infectado marcado con Metionina^{35S}, aparecieron fracciones con radioactividad no observada en las fracciones homólogas de los gradientes control, donde se había analizado extracto citoplasmático infectado marcado con Metionina^{35S} en ausencia de DNA.

Cuando se analizó la proteína asociada al DNA, mediante electroforesis en gel de acrilamida, se observó una proteína de aproximadamente 55 Kd. Sugerimos que ésta proteína de 55 Kd es inducida por el virus, probablemente entre las 2 1/2 y 3 1/2 hs después de iniciada la infección y que se une al promotor tardío de Adenovirus-2.

Dado que estos resultados se obtuvieron en condiciones muy parecidas a las empleadas al estudiar la inhibición de la transcripción "in vitro", sugerimos que ésta proteína de 55 Kd posiblemente se encuentra involucrada en el mecanismo de la inhibición de la transcripción inducida por Poliovirus.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

- Fig. 1 Organización del genoma del virus de la poliomielitis.
- Fig. 2 Mapa de restricción y análisis del plásmido pLAX con las enzimas Ava I-Bam HI.
- Fig. 3 Análisis en minigeles de agarosa de los fragmentos de restricción Ava I-Bam HI del plásmido pLAX purificados en gradientes lineales de sacarosa.
- Fig. 4 Síntesis de proteína en células HeLa infectadas con el virus de la poliomielitis.
- Fig. 5 Análisis mediante electroforesis de extractos citoplasmáticos obtenidos de células HeLa infectadas con el virus de la poliomielitis y de células HeLa control.
- Fig. 6 Análisis en gradientes lineales de sacarosa de mezclas de transcripción "in vitro".
- Fig. 7 Análisis en gradientes lineales de sacarosa de mezclas de transcripción "in vitro" control.

Fig. 8 Asociación de proteína marcada con Metionina^{35S} a los fragmentos de Adenovirus-2 conteniendo el promotor tardío.

Tabla 1 Actividad específica en proteínas totales de extractos citoplasmáticos obtenidos de células HeLa infectadas con el virus de la poliomielitis.

I N T R O D U C C I O N

1. VIRUS DE LA POLIOMIELITIS.

El virus de la poliomielitis o Poliovirus pertenece al grupo de los Picornavirus, familia Picornaviridae, género Enterovirus (Rekosh,1977). Fué descubierto por Landsteiner y Popper en 1909, cuando lograron transmitir la enfermedad a monos, por inoculación intracerebral de un filtrado libre de bacterias proveniente de la médula espinal de un enfermo humano.

En el hombre, la infección producida por el virus de la poliomielitis comienza por la ingestión del virus y su multiplicación primaria en la mucosa orofaríngea e intestinal; una vez iniciado el proceso infeccioso muy pronto son invadidas las amígdalas y las placas de Peyer del íleon, posteriormente los virus pasan a los ganglios cervicales profundos y meséntéricos y de ahí se propagan a la sangre; en el caso de que se produzca una viremia persistente, los virus alcanzan el sistema nervioso central ocasionando el síndrome clínico de la parálisis.

Ya que la poliomielitis ocurría en grandes epidemias y tenía efectos muy graves, se desarrolló una investigación intensiva para encontrar la cura. Esta investigación culminó con la elaboración de vacunas (Salk,1955;Sabin,1962) que han permitido erradicar la enfermedad en la mayor parte del mundo.

En la actualidad la investigación con Picornavirus no ha cesado ya que su simplicidad ha permitido que se les utilice como

sistemas modelo de la expresión genética tanto viral como celular.

De entre las características que los hacen ideales para estudios moleculares detallados, se puede mencionar que se encuentran entre los virus animales más sencillos y pequeños, que pueden ser crecidos rápidamente en células de muy diferentes orígenes y que son extremadamente estables y fáciles de purificar.

En este trabajo se utilizó la infección de células HeLa con Poliovirus como un sistema modelo para conocer más acerca del mecanismo de patogenia viral y por otra parte, para conocer más acerca del proceso de la transcripción en células eucarióticas, ya que como se evidenciará posteriormente, este virus inhibe la síntesis de RNA del hospedero a nivel de la iniciación de la transcripción.

a. Estructura.

Los polioviriones son partículas ribonucleoprotéicas esféricas que exhiben simetría icosaédrica (Finch y Klug, 1959). El diámetro de estas partículas es de 20 a 30 nm (Rueckert, 1971), están compuestas de un 70% de proteína y un 30% de RNA (Burness, 1973) y tienen un peso de aproximado de 8.5×10^6 daltones (Rueckert, 1971). Estos viriones carecen de carbohidratos (Drzeniek y Billelo, 1974). Se ha reportado que el ácido mirístico (ácido n-tetradenónico) está covalentemente ligado a la proteína de la cápside VP4 y sus precursores VP0 y P1 (ver Figura No.1) en Poliovirus y otros Picornavirus; la miristilización parece ser una propiedad general de los Picornavirus y ser esencial en su organización estructural y replicación (Chow y cols., 1987).

Las cápsides virales están compuestas de cuatro distintas proteínas estructurales, denominadas VP1, VP2, VP3 y VP4, con pesos moleculares aproximados de 34,000, 30,000, 26,000 y 7,000 daltones respectivamente (Hannecak y cols., 1984).

La mayoría de los estudios indican que las cápsides virales están constituidas por 60 subunidades estructurales, y que cada subunidad contiene una copia de cada una de las proteínas estructurales antes mencionadas (Rueckert, 1985). En adición pequeñas cantidades (una o dos copias por partícula) de una quinta proteína VP0 (de aproximadamente 37,000 daltones) han sido detectadas en preparaciones de virus altamente purificados.

b. Genoma.

El genoma de Poliovirus consiste de una molécula de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva, es decir que tiene la misma polaridad que el RNAm viral. Este RNA tiene un peso molecular de aproximadamente 2.6×10^6 daltones (Tannock y cols.,1970) y consta de 7433 nucleótidos, se encuentra poliadenilado en el extremo 3' y unido covalentemente a una pequeña proteína denominada VPg en el extremo 5' (Kitamura y cols.,1981).

Como la mayoría de los RNAs eucarióticos el RNA de Poliovirus posee en su extremo 3' una región de residuos de ácido adenílico (poli-A), se ha estimado que esta región contiene de 50 a 125 nucleótidos (Yoqo y Wimmer,1972).

El RNAm viral es idéntico al RNA contenido en el virión, excepto en que, la proteína VPg ha sido eliminada de su extremo 5'. El mensajero viral tiene en su lugar un fosfato 5' libre (Nomoto y cols.,1977) característica muy inusual entre los RNAs encontrados en las células eucarióticas donde la mayoría de los mensajeros celulares y virales poseen en su extremo 5' terminal la estructura m^7GpppN denominada "cap" (Abraham y Cooper,1975). Esta estructura ha demostrado ser en muchos casos esencial para que ocurra la traducción (Rose y Lodish,1976), sin embargo el RNAm de Poliovirus se traduce sin la presencia de este residuo (Rekosh,1977).

c. Replicación Viral Intracelular.

c.1. Adsorción, desencapsidación y penetración.

La adsorción de Poliovirus a células susceptibles como las de humano y las provenientes de primates, esta determinada por la presencia de receptores específicos que se encuentran en la superficie celular. La actividad receptora de Poliovirus parece existir como un complejo de glucoproteínas y lipoproteínas (McClaren,1968). Trabajos realizados con células híbridas de ratón humano, establecieron que el cromosoma humano 19, que aparentemente codifica una proteína de la membrana plasmática humana, es esencial para la susceptibilidad de los heterocariotes a la infección con Poliovirus (Miller y cols.,1974).

Estudios iniciales demostraron que la fijación inicial de los Poliovirus a las células susceptibles era reversible si se llevaba a cabo en frío (Fenwick y Cooper,1962), y que a temperaturas cercanas a 37°C el eclipse viral sobreviene rápidamente (Holland,1962).

Recientemente se ha demostrado que durante la fijación de Poliovirus a las células susceptibles ocurre un reacomodo conformacional, que ocasiona en la partícula viral, la pérdida de la proteína interna VP4 y la extrusión del terminal-N de la proteína VP1. Se ha sugerido que el terminal-N en coordinación con la proteína VP4 miristoilada, participan directamente en la fijación del virus a la membrana de la célula hospedera (Filman, D.J. y cols.,1989).

c.2. Síntesis de proteína viral.

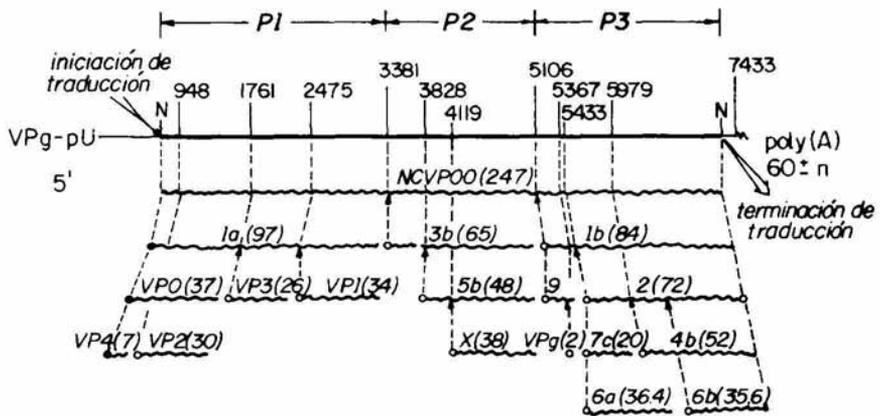
La síntesis de proteína específica del virus se lleva a cabo en el citoplasma de la célula, en grandes polirribosomas recién sintetizados, compuestos de 35 ribosomas asociados a una cadena de RNAm viral (Summers y cols.,1967). Estos polirribosomas virales reemplazan completamente a los polirribosomas celulares que son más pequeños. Gran parte del RNAm viral que se produce tempranamente en el ciclo infeccioso se incorpora en estos polirribosomas (Levintow,1974). Pocos minutos después de que una molécula de RNAm ha sido liberada de su sitio de síntesis, ésta se asocia a un ribosoma. El polirribosoma viral se forma cuando da comienzo la traducción del mensajero y el ribosoma inicial se mueve en la dirección 5' a 3', permitiendo la fijación de ribosomas adicionales; el proceso entero de ensamblaje requiere de aproximadamente 10 minutos y la traducción de una molécula de RNAm viral requiere de cerca de 5 minutos (Huang y Baltimore,1970). Existe mucha evidencia experimental de que los polirribosomas específicos del virus están fuertemente unidos a membranas citoplasmáticas (Levintow,1974; Caliguiri y Tamm,1970 a.b.).

Diferentes reportes apoyan la idea de que existe únicamente un sitio de iniciación de la traducción en el RNAm viral, al parecer, ésta se inicia en un codón AUG a 743 nucleótidos del extremo 5' terminal y continúa hasta un codón de terminación a 71 nucleótidos del extremo 3' terminal (Dorner y cols.,1982; Kitamura y cols.,1981).

La primera sugerencia de que algunas proteínas virales eran

derivadas de otras, fué realizada por Summers y Maizel (1968) basados en la observación de que, la suma de los pesos moleculares de las 14 proteínas específicas del virus, que ellos detectaban en células Hela infectadas con Poliovirus, excedía en más del doble la capacidad codificadora del RNAm viral. Fué rápidamente confirmado por experimentos de pulso y caza "in vivo", que algunas proteínas virales eran precursoras de otras (Maizel y Summers, 1968; Holland y Kiehn, 1969). Por tratamiento de células infectadas con aminoácidos análogos (Jacobson y cols., 1970; Jacobson y Baltimore, 1968), zinc (Butterworth y Korant, 1974) o inhibidores de enzimas proteolíticas (Summers y cols., 1972) ha podido ser detectada una gran poliproteína, que ha sido denominada NCPVPOO con un peso molecular aproximadamente 247,000 daltones (Kitamura y cols., 1981). Esta poliproteína representa el total de la información traducible contenida en el genoma viral, se cree que puede ser el único producto protéico a partir del cual todas las otras proteínas específicas del virus se derivan (Jacobson y Baltimore, 1970).

NCPVPOO está organizada en tres regiones (ver Figura No. 1), la región P1, codificada cerca del extremo 5' del RNAm viral, comprende las proteínas de la cápside y sus precursores (Taber y cols., 1971; Summers y Maizel, 1971), la región P2, que corresponde a la parte central del genoma, comprende una proteasa (Korant y cols., 1979) y otros polipéptidos de función desconocida, y la región P3, codificada cerca del extremo 3', comprende una proteasa (Palmenberg y cols., 1979), VPg (Kitamura, 1980) y la RNA polimerasa viral (Lundquist y cols., 1974; Flanagan y Baltimore, 1979).



Ya que NCPVGN no puede ser detectada en células infectadas a menos que se sometan a los tratamientos antes mencionados, el procesamiento de la cadena polipeptídica naciente debe ocurrir antes de que el ribosoma haya atravesado el genoma entero. Se ha propuesto que los productos primarios de la traducción P1-la, P2-X y P3-lb, se originan por la acción de alguna(s) proteasa(s) de la célula hospedera (Korant y cols.,1980), o bien por hidrólisis autocatalítica (Kitamura y cols.,1981). Por otra parte, se ha demostrado que el procesamiento proteolítico de P1-la y P3-lb en productos secundarios, es catalizado por proteasas codificadas por el genoma viral (Palmenberg y cols.,1979).

c.3. Replicación del RNA viral.

La síntesis de RNA viral procede de acuerdo a un patrón de tiempo que ha sido bien definido, comienza dentro de los primeros 30 minutos después de iniciada la infección, y continua a una velocidad exponencial hasta las 3 o 4 horas, posteriormente la velocidad se torna lineal (Baltimore,1969) hasta que gradualmente cesa alrededor de las 7 u 8 horas después de iniciada la infección.

Mediante el fraccionamiento de células infectadas que han sido marcadas con pulsos breves, se ha demostrado que el sitio de la síntesis de RNA viral es una estructura formada por las membranas lisas de la célula que ha sido denominada "complejo de replicación" (Caliquiri y Tamm,1970,a.b.). Este complejo está completamente separado de los polirribosomas virales (Huang y Baltimore,1970), hasta ahora no se ha encontrado ninguna evidencia que permita coordinar la síntesis de proteína y de RNA viral. La síntesis de proteína viral debe ocurrir antes de que comience la replicación, ya que ésta requiere de proteínas virales recién sintetizadas.

El complejo de replicación contiene una molécula denominada RNA intermediario replicativo, que ha demostrado ser el sitio exacto de la replicación viral (Girard,1969; Baltimore,1969; Levintow,1974). La estructura de esta molécula ha sido investigada de diferentes maneras, pero aún no está completamente claro que estado tiene en las células infectadas. Estudios realizados "in vivo" (Thach y cols.,1974) e "in vitro" (Oberg y Phillipson,1971; Baltimore,1968; Baltimore,1969) han permitido

representar al intermediario replicativo, como una molécula de RNA de cadena sencilla, parcialmente cubierta con 4 o 5 cadenas en crecimiento de RNA complementario, con cada cadena naciente unida al templado mediante apareamiento de bases en una región muy pequeña y una molécula de polimerasa viral.

Se ha propuesto que la replicación del RNA viral puede llevarse a cabo de acuerdo al siguiente modelo. El RNA viral funciona como templado para la síntesis de RNA complementario. Algunas moléculas de RNA complementario son sintetizadas simultáneamente, cada una por una molécula de polimerasa independiente. Posteriormente estas moléculas funcionan como templados para la síntesis de nuevas moléculas de RNA viral (Fenner y cols.,1972).

El modelo anterior sugiere la existencia de dos tipos de Intermediario Replicativo, uno involucrado con la síntesis de cadenas de RNA complementario (-) y otro con la síntesis de cadenas de RNA con la polaridad positiva original (Levinow,1974). En apoyo a esta hipótesis existe evidencia genética de que puede haber dos diferentes formas de polimerasa viral. Se han aislado mutantes sensibles a temperatura que pueden sintetizar ambos tipos de cadena, ningún tipo de cadenas o únicamente cadenas complementarias (Cooper y cols.,1971; Cooper y cols.,1970).

Dos diferentes formas de replicasa viral han sido halladas en el citoplasma de células infectadas con Poliovirus. Primeramente se detectó una RNA polimerasa viral dependiente de RNA, fuertemente unida a su templado (Baltimore y cols.,1963). Posteriormente se logró purificar una RNA polimerasa viral

dependiente de RNA y de un "primer" de Oligo (U), que es capaz de sintetizar "in vitro" cadenas completas de RNA complementario (Flanegan y Baltimore,1977). Se ha reportado que una proteína de aproximadamente 67,000 daltones, purificada de células no infectadas, es capaz de substituir al "primer" de Oligo (U) catalizando la transcripción "in vitro" del RNA viral (Dasgupta,1983; Baron y Baltimore,1982). Se cree que el factor del hospedero está involucrado con la iniciación de la síntesis de cadenas de RNA (-) a partir de cadenas de RNA (+), y que la RNA polimerasa viral está involucrada con el alargamiento de las cadenas (Dasgupta,1983).

Ya que ambas actividades enzimáticas tienen en común un polipéptido de aproximadamente 63,000 daltones, se cree que corresponden a dos diferentes formas de una misma proteína (Flanegan y Baltimore, 1979).

c.4. Ensamblaje y liberación de los virus.

Se ha sugerido y apoyado por evidencia experimental que la formación de partículas virales y la replicación del RNA viral son procesos acoplados que se llevan a cabo en asociación con las membranas lisas de la célula (Caliquiri y Mosser, 1971; Caliquiri y Compans, 1973). Aún no se conoce el mecanismo de transporte a través del cual, las subunidades estructurales llegan a los complejos de replicación, donde se cree ocurre la maduración de los virus.

Estudios de marcaje han demostrado que el RNA viral sintetizado, comienza a ser encapsidado en partículas virales hasta las 2 1/2 horas después de iniciada la infección, y que a las 4 horas, el 20% del RNA total sintetizado ha sido encapsidado. También han demostrado que una molécula de RNA puede ser encapsidada en menos de 5 minutos después de su síntesis, por proteína viral preexistente. Esta última conclusión está basada en el hecho de que, la inhibición de la síntesis protéica por cicloheximida, no afecta la velocidad de entrada del RNA en partículas virales (Baltimore, Girard y Darnell, 1966).

El ensamblaje de los virus involucra una serie de eventos, mediante los cuales, las proteínas de la cápside se agregan, en estructuras de tamaño creciente. Las proteínas de la cápside provienen de un polipéptido precursor denominado P1-la (ver Figura No.1) (Jacobson y Baltimore, 1968, a.b.). Este polipéptido se escinde en tres proteínas: VP0, VP1, y VP3 (Jacobson y cols., 1970; Summers y Maizel, 1968). Cantidades equimolares de estas tres proteínas son ensambladas en unidades estructurales

cada vez más complejas, que se llegan a combinar con el RNA viral para formar el virión completo.

A partir de las estructuras intermediarias que pueden ser detectadas en células infectadas con Poliovirus, se ha deducido la secuencia de eventos que se llevan a cabo durante la morfogénesis del virión .

El primer paso durante la morfogénesis, es la agregación del polipéptido precursor de las proteínas de la cápside P1-la, para formar un pentámero que sedimenta a 14s (Watanabe y cols.,1962; Phillips y Fennel,1973).

Una vez formadas las partículas 14s, ocurre el procesamiento proteolítico de cada polipéptido precursor P1-la para generar las proteínas estructurales VP0, VP1 y VP3. Los pentámeros escindidos (partículas 14s) se agregan para formar una cápside vacía estable que sedimenta aproximadamente a 75s y que ha sido llamada procápside (Jacobson y Baltimore,1968; Phillips,1971; Phillips y Fennel,1973).

El siguiente evento durante el ensamblaje, es la adición del RNA viral a la procápside para formar un nuevo intermediario, el provirión que sedimenta a 125s (Fernández-Tomás y Baltimore,1973). La conversión de procápside a provirión también puede llevarse a cabo "in vitro" (Fernández-Tomás y cols.,1973). El RNA contenido en el provirión es insensible a la digestión con ribonucleasa, aunque la partícula es convertida fácilmente en procápside y RNA libre por tratamiento con EDTA (Fernández-Tomás y Baltimore,1973).

El último paso en la morfogénesis, involucra la conversión proteolítica de la mayoría de las proteínas VP0 en las proteínas

estructurales VP2 y VP4, dando lugar a la formación de viriones maduros que sedimentan a 155s. Algunas proteínas VP0 quedan sin procesar. El virión maduro es insensible a una gran variedad de agentes químicos, incluyendo el SDS y el EDTA que desnaturalizan los precursores estructurales este último procesamiento proteolítico debe causar un gran cambio conformacional en la cápside la partícula viral (Jacobson y Baltimore,1968).

Una vez que ha ocurrido la maduración de los viriones, estos son liberados por ruptura de la membrana celular. Estudios realizados con microscopía electrónica han sugerido, que la progenie viral puede ser liberada de la célula hospedera, a través de vesículas citoplasmáticas asociadas a virus que llegan a abrirse al espacio extracelular (Dunnebacke y cols.,1969). Por otra parte, también existe la posibilidad de que grandes cantidades de virus, sean liberadas de forma discontinua, mediante el burbujeo de complejos filamentosos asociados con virus (Dunnebacke y cols.,1969) o por liberación de cristales de viriones (Dales,1965).

d. Alteración de las funciones del hospedero.

Después de la adsorción de las partículas virales a la célula hospedera sobreviene el período de eclipse. Durante este período no es posible recuperar partículas infecciosas estables y sólo algunos productos específicos del virus pueden ser detectados. Sin embargo es durante este período cuando el virus afecta de manera más significativa el metabolismo de la célula (Rekosh,1977).

d.1. Inhibición de la síntesis de proteína celular.

La infección de células HeLa con Poliovirus induce una rápida y completa inhibición de la síntesis de proteína celular. Dentro de las 3 primeras horas del ciclo infeccioso, la velocidad de síntesis proteica celular decae a cerca del 50% en relación a la velocidad inicial, luego sigue decayendo y hacia el final de la infección la velocidad de síntesis ha disminuido a un 20%. A las 3 horas después de iniciada la infección la mayoría de las proteínas sintetizadas son específicas del virus (Levintow,1974). La inhibición de la síntesis de proteína celular es paralela a la desagregación gradual de los polirribosomas celulares y al ensamblaje gradual de los polirribosomas virales que son más grandes (Penman y cols.,1963).

La inhibición de la síntesis de proteínas de la célula hospedera no requiere de la replicación del virus, pero si requiere de la traducción del genoma viral. Si el genoma de Poliovirus es irradiado con luz U.V. antes de infectar a las

células, no se observa la inhibición de la traducción del hospedero. El tratamiento con luz U.V., ocasiona entre otras alteraciones, la formación de dímeros de uridina en el RNA, bloqueando de esta manera su traducción (Helentjaris y Ehrenfeld,1977). Si las células son infectadas en presencia de puromicina, al eliminar la droga, se reinicia la síntesis de proteína a niveles semejantes a los de las células control, por un corto tiempo antes de que ocurra la inhibición de la síntesis de proteína celular. Por tanto si la traducción del virus es evitada, no se forma el supuesto inhibidor viral de la síntesis protéica celular (Penman y Summers,1965).

Aún no está claro que productos específicos del virus son necesarios para producir el efecto inhibitorio. Se han aislado algunos mutantes de Poliovirus sensibles a temperatura, defectivos en la producción de proteínas estructurales, que son incapaces de inhibir la traducción del hospedero a temperatura no permisiva (Steiner-Pryor y Cooper,1973). Sin embargo, también se ha reportado que la infección de células con partículas de Poliovirus de interferencia defectiva que carecen de un segmento de RNA que codifica cerca de un tercio de la proteína estructural, son tan efectivas como los virus del tipo silvestre para ocasionar la inhibición de la traducción del hospedero (Cole y Baltimore,1973).

Durante la infección con Poliovirus se ha demostrado que los RNAsm celulares no son degradados (Leibowitz y Penman,1971; Colby y cols.,1974; Kaufman y cols.,1976) ni modificados (Fernández Muñoz y Darnell,1976) y que son funcionales cuando son extraídos de las células infectadas y usados en sistemas de traducción "in

vitro" (Kaufman y cols., 1976; Ehrenfeld y Lund, 1977).

En células infectadas con Poliovirus no se forman complejos de iniciación con los RNAs_m celulares, únicamente se forman con los RNAs (+) virales (Leibowitz y Penman, 1971; Ehrenfeld y Manis, 1979). Estas observaciones han sugerido que el bloqueo de la síntesis protéica celular se lleva a cabo a nivel de la iniciación de la traducción. Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar el fenómeno inhibitorio, de entre estos pueden citarse los siguientes: con base en estudios de bloqueo de la iniciación de la síntesis protéica con medio hipertónico (Nuss y cols., 1972; Saborío y col., 1974), se ha postulado que la infección con Poliovirus ocasiona una alteración en la permeabilidad celular, provocando una concentración aumentada de cationes monovalentes dentro de la célula, ocasionando a su vez la traducción preferencial de los RNAs_m virales. Carrasco y Smith (1983) encontraron que tanto el rompimiento del gradiente de iones monovalentes, como el incremento intracelular de iones sodio, ocurría horas después de que la síntesis de proteínas celulares había sido inhibida. Fernández-Tomás (1983) ha encontrado que la concentración de sodio extracelular, ocasiona la acumulación intracelular del catión y disminuye proporcionalmente el período "lag" requerido para que se manifieste la inhibición de la síntesis de las proteínas celulares, sin que se altere el tiempo requerido para la síntesis de proteínas de Poliovirus. En general puede decirse que la evidencia disponible en células intactas no apoya fuertemente la teoría de que un incremento de iones sodio dentro de la célula sea responsable de la inhibición de la síntesis protéica celular

a tiempos tempranos de la infección. Sin embargo ya que tardíamente en el ciclo infeccioso ocurre una alteración en la permeabilidad celular, no se ha excluido la posibilidad de que éste fenómeno tenga que ver con la inhibición de la traducción del hospedero a tiempos tardíos.

Una de las teorías que ha recibido mayor soporte experimental involucra la inactivación de un factor de iniciación, necesario para la traducción de los RNAsm celulares, pero no para la traducción de los RNAsm virales. Helentjaris y Ehrenfeld (1978) utilizando sistemas de traducción "in vitro", han demostrado que los factores de iniciación aislados de células infectadas con Poliovirus no promueven la iniciación de la traducción en polirribosomas que contienen RNAm celular endógeno, pero si estimulan la iniciación de la traducción en polirribosomas que contienen RNAm viral endógeno. Una preparación similar de factores de iniciación proveniente de células no infectadas fué capaz de promover la iniciación de la traducción tanto de RNAsm celulares como de RNAsm virales. Estas evidencias sugirieron que los factores de iniciación durante la infección con Poliovirus habían perdido la capacidad de reconocer los RNAsm "cubiertos" en su extremo 5' por la estructura denominada "cap" (M⁷Gppp).

Se ha purificado una actividad que restaura la traducción de los RNAsm con "cap", y se ha demostrado que se encuentra asociada a un gran complejo protéico que se une al "cap" (Sonenberg y cols., 1979; Tahara y cols., 1981; Trachsel y cols., 1980). Se encontró que la actividad restauradora era lábil (Trachsel y cols., 1980) y que era una proteína de 24 Kd (Sonenberg, 1978). Al

parecer la infección con Poliovirus ocasiona la disociación de esta proteína del complejo mayor de factores de iniciación (Fhrenfeld,1982). No se ha determinado si la disociación es causada por un producto específico del virus.

d.2. Inhibición de la síntesis de DNA de la célula hospedera.

La síntesis de DNA celular es también inhibida durante la infección con Picornavirus, pero más tardíamente y menos severamente que la síntesis de RNA celular (Hand y Oblin,1977). La mayoría de la evidencia disponible apoya la idea de que ésta inhibición ocurre como un efecto secundario de la inhibición de la síntesis protéica del hospedero (Hand y Tamm,1972; Levintow,1974).

d.3. Inhibición de la Síntesis de RNA celular.

La infección de células de mamífero con Picornavirus ocasiona rápida inhibición de la síntesis de RNA celular (Fernández-Tómas,1987). Mientras el mecanismo de la inhibición de la síntesis protéica del hospedero ha sido intensamente estudiado, es poco lo que se conoce acerca del mecanismo de la inhibición de las funciones nucleares de la célula inducido por el virus.

Estudios previos han indicado que la inhibición de la síntesis de RNA celular no es debida al decremento en la poza de precursores (Plagemann,1971), ni a la destrucción del templado de DNA (Holland y Peterson,1964), ni a la rápida degradación de los RNA producidos (Franklin y cols.,1962; Colby y cols.,1974; Fernández-Muñoz y cols.,1976).

El mecanismo de la inhibición de la transcripción del hospedero esta caracterizado por una rápida pérdida de la actividad de la RNA polimerasa II (que sintetiza el RNAm o heterogéneo nuclear), un decaimiento mucho más lento de la actividad de la RNA polimerasa I (que sintetiza el RNAr) y ningún cambio aparente en la actividad de la RNA polimerasa III (que sintetiza el RNA 5s y el RNA₆ (Miller y Penhoet,1972; Bossart y cols.,1984).

Experimentos realizados con Poliovirus y otros Picornavirus han establecido que la cinética de la inhibición de la transcripción del hospedero, varía de acuerdo a la línea celular y al virus utilizado (Rekosh,1977). En células Hela infectadas con Poliovirus se ha demostrado que la actividad de la RNA

polimerasa II comienza a declinar alrededor de los 80 minutos después de iniciada la infección, para luego seguir decayendo, a las 2 hs post infección la actividad ha decaído a un 50% en relación a la encontrada en células normales y a las 3 hs postinfección un 90% de la actividad de la RNA polimerasa II se encuentra inhibida (Crawford y cols.,1981; Flores-Otero y cols.,1982).

Uno de los blancos del mecanismo inhibitorio parecerían ser las moléculas de RNA polimerasa II del hospedero. La RNA polimerasa II purificada a partir de una gran variedad de células eucarióticas consiste de una mezcla de tres distintas subespecies, denominadas IIO, IIA y IIB (para una revisión ver Schwartz y cols.,1975). Cada enzima está compuesta de 10 subunidades y difieren en la aparente masa molecular de su subunidad más grande (IIO 240,000 da, IIA 214,000 da, IIB 180,000 da, para la enzima de timo de ternera). La subespecie de la enzima IIO, es la forma predominante, en células en crecimiento activo (García-Carranca y cols.,1986; Kim y Dahmus,1986), y está preferencialmente asociada con la cromatina celular y viral (Bartholomew y cols.,1986; García-Carranca y cols.,1986).

Recientemente se ha reportado que en células HeLa infectadas con Poliovirus, la inhibición de la síntesis de RNAm celular coincide con la modificación de la RNA polimerasa IIO, que es aparentemente, la forma de la enzima transcripcionalmente activa "in vivo" (Rangel y cols.,1987) y, que ésta modificación, parece ser dependiente de la síntesis y procesamiento de proteína viral (Rangel y cols.,1988).

La velocidad de alargamiento de cadenas de RNA, no está

modificada en células infectadas, sin embargo se ha demostrado que, a medida que transcurre la infección, va disminuyendo el número de moléculas de RNA polimerasa II comprometidas en el alargamiento de cadenas (Aprietti y Penhoet, 1978; Flores-Otero y cols., 1982).

Puede decirse que, de acuerdo a los datos reportados hasta el momento, muy probablemente, el virus interactúa con la regulación de la síntesis de RNA del hospedero a nivel de la iniciación de la transcripción.

El establecimiento de sistemas de transcripción "in vitro" para el estudio de la síntesis de RNA, ha constituido un desarrollo muy importante para la elucidación de los mecanismos de control transcripcional y de expresión genética en los organismos eucarióticos. Estos sistemas libres de células, han proporcionado una nueva aproximación para elucidar el mecanismo de la inhibición de la síntesis de RNA celular inducido por Poliovirus.

Algunos estudios se han realizado con sistemas de transcripción "in vitro" que consisten básicamente de extractos de células completas o de extractos citoplasmáticos, que inician selectiva y exactamente la transcripción, sobre templados de DNA exógeno que contienen un promotor eucariótico.

El sistema de transcripción "in vitro" desarrollado por Weil (1979) consiste de un extracto citoplasmático (S-100) que requiere de la adición de RNA polimerasa II y de un templado de DNA. El sistema de transcripción "in vitro" desarrollado por Manley (1980) consiste de un extracto de células completas (extracto de Manley) que requiere de la adición de un templado de

DNA y de los 4 ribonucleótidos necesarios para la transcripción.

En los sistemas antes mencionados, se ha utilizado fundamentalmente como templado de DNA exógeno, la unidad de transcripción tardía de Adenovirus-2 debido a que esta posee un promotor fuerte, es decir, que es activamente transcrita por la RNA polimerasa II, y a que utiliza los factores de la célula hospedera, para su transcripción (Price y Penman, 1972; Wallace y Kates, 1982).

Fraqueutos de la unidad de transcripción tardía de Adenovirus-2 conteniendo el promotor, han sido clonados en pBR322. La utilidad de estos plásmidos radica en que a partir de ellos, mediante enzimas de restricción, es posible obtener templados de DNA de longitud definida que, al ser ensayados en un sistema de transcripción "in vitro", generan un transcrito específico que puede ser monitoreado como una banda de RNA, cuando se analiza mediante electroforesis, permitiendo cuantificar la iniciación exacta de la transcripción.

Se ha demostrado que "in vitro", la RNA polimerasa II purificada, por sí sola, únicamente puede transcribir de manera azarosa los templados de DNA exógeno, y que para que se lleve a cabo la transcripción específica a partir del promotor, el sistema debe ser suplementado con factores que se encuentran presentes en extractos crudos provenientes de células normales (Weil y cols., 1979).

Con el fin de purificar los factores que regulan la especificidad de la transcripción "in vitro" se han realizado fraccionamientos cromatográficos de extractos celulares. Mediante cromatografía se han logrado separar 5 diferentes fracciones

denominadas, TFIIA, TFIIR, TFIIC, TFIID y TFIIE, que al ser adicionadas a un sistema de transcripción "in vitro", hacen posible que se lleve a cabo la iniciación exacta de la transcripción a partir del promotor tardío de Adenovirus-2 (Matsui y cols.,1980; Samuels y cols.,1982; Dynan y Tjian,1983; Fire y cols.,1984; Moncollin y col.,1986). El papel exacto de todos los factores de transcripción presentes en estas fracciones aún no es conocido, aunque hay evidencia directa e indirecta de que algunos de estos factores interactúan con secuencias particulares de DNA dentro del promotor (Carthew y cols.,1985; Sawagodo y cols.,1985; Davison y cols.,1983; Egly y cols.,1984; Parker y Topol,1984; Reinberg y Roeder,1987; Reinberg y cols.,1987). Recientemente se ha reportado la purificación de un factor de transcripción general que se une a la RNA polimerasa II, para formar un complejo estable y que es requerido para la transcripción específica a partir del promotor tardío de Adenovirus-2 (PMT-Adeno-2) (Xin-Min Zheng y cols.,1987).

Crawford (1981) y Klierer y Dasgupta (1988) han demostrado que la inhibición de la transcripción inducida por Poliovirus puede ser estudiada "in vitro". En contraste con los extractos citoplasmáticos obtenidos de células HeLa bajo infección fingida, los extractos obtenidos de células infectadas con Poliovirus fueron incapaces de promover la transcripción mediada por la RNA polimerasa II a partir del PMT-Adeno-2. La adición de una fracción de extracto citoplasmático no infectado (obtenida de un fraccionamiento en fosfocelulosa) conteniendo factores específicos de la iniciación de la transcripción, fué capaz de restaurar la actividad transcripcional de los extractos

citoplasmáticos infectados. Kliever y Dasgupta (1988) demostraron que el factor de la transcripción, que copurifica con el factor transcripcional TFIID, está inactivado en las células Hela infectadas con Poliovirus. Estos resultados sugieren que uno o más factores, requeridos para la iniciación específica de la transcripción, se encuentran inactivados en las células Hela infectadas con Poliovirus.

Aunado a las evidencias de modificación o inactivación de factores específicos de la iniciación de la síntesis de cadenas de RNA en células Hela infectadas con Poliovirus, otras líneas de evidencia experimental, han sugerido la existencia de un inhibidor viral de la transcripción celular. Esta posibilidad, se fundamenta principalmente en el hecho de que se requiere de la traducción del genoma del virus para que ocurra la inhibición de la transcripción del hospedero (Baltimore y Franklin, 1963). La naturaleza exacta del inhibidor viral, no ha sido aún determinada. Lípidos o lipoproteínas (Ho y Washington, 1971) así como proteínas virales (Balandin y Franklin, 1964; Fernández-Tomás, 1982; Bossart y cols., 1982; 1984; Iturriaga, 1984; Núñez, 1985), han sido postulados como el (los) agente (s) inhibitorio (s) de la transcripción celular.

Esta hipótesis se encuentra apoyada por las evidencias obtenidas de estudios realizados con ensayos de transcripción "in vitro" que requieren de núcleos purificados. Se ha demostrado que la preincubación de núcleos aislados de células normales con extractos citoplasmáticos provenientes de células infectadas con Poliovirus, induce una inhibición selectiva de la actividad de la RNA polimerasa II, y una acumulación de proteínas virales en el

interior del núcleo. Estos resultados han sugerido que productos virales, presumiblemente proteínas virales, deben penetrar en el núcleo para ejercer su actividad inhibitoria (Bossart y cols., 1982; 1984).

En apoyo a lo anterior, hay varios reportes que demuestran la acumulación de proteínas virales en el interior de los núcleos de células infectadas con Poliovirus (Fernández-Tomás, 1982; Bienz y cols., 1982; Bossart y cols., 1982; 1984) y que su aparición en el núcleo coincide con el inicio de la inhibición de la transcripción de la célula hospedera.

Las evidencias particulares de la existencia de un inhibidor viral en las que se encuentra basado el presente trabajo son las siguientes:

Se ha demostrado que tanto en el núcleo como en el citoplasma de células infectadas con Poliovirus, hay una acumulación de una proteína de aproximadamente 35,000 da que presenta una alta afinidad por la cromatina. El hecho de que ésta proteína se encuentre únicamente en células infectadas y de que exhiba una alta afinidad por el DNA, sugiere básicamente, que se encuentra involucrada en el mecanismo de la inhibición de la transcripción de la célula hospedera (Nóñez, 1985).

Por otra parte, estudios realizados con un sistema de transcripción "in vitro" que inicia específicamente y que es dependiente de DNA exógeno han proporcionado más evidencia de la existencia de un inhibidor viral. El sistema consiste en un extracto crudo de células HeLa completas (extracto de Manley), los 4 ribonucleótidos requeridos para la transcripción y un templado de DNA de Adenovirus-2 que contiene el promotor tardío

(PMT-Adeno-2). la obtención del templado requiere de la restricción del plásmido pIAX (obsequio del Dr. Tjian, Berkeley, Cal.) que contiene un fragmento de la unidad de transcripción tardía de Adenovirus-2 que va de 15.5 a 18.5u en el cual se localiza el promotor (ver Figura No. 2). Con este sistema de transcripción "in vitro" se demostró que, cuando se incubaba en primera instancia el templado de DNA con un extracto citoplasmático obtenido de células HeLa infectadas con Poliovirus y, posteriormente se ensaya en condiciones de transcripción "in vitro" en presencia de un extracto celular completo (extracto de Manley) no infectado, se observa una inhibición de la transcripción "in vitro" a partir del PMT-Adeno-2; sin embargo, se demostró que si la secuencia de incubaciones se invierte, esa inhibición no se detecta.

Estos resultados sugieren que un factor presente en el extracto citoplasmático infectado, compite con algún factor requerido para la iniciación específica de la transcripción presente en el extracto de Manley no infectado, por una secuencia promotora o por un sitio cercano a ésta (Iturriaga, 1984).

e. Objetivos.

En base a los datos presentados y a las evidencias particulares antes mencionadas los objetivos del presente trabajo fueron:

1) Determinar si hay asociación de proteína de Poliovirus al DNA (fragmentos de 1568 p.b. conteniendo el promotor tardío de Adenovirus-2), cuando éste se incubaba en condiciones de transcripción "in vitro", con un extracto citoplasmático proveniente de células HeLa infectadas con Poliovirus.

2) Aislamiento del complejo DNA-proteína con el fin de identificar mediante electroforesis en acrilamida, la o las proteínas asociadas.

M A T E R I A L E S

a. Origen de los materiales.

a.1. Material biológico.

Se trabajó con el plásmido pLAX (Amp^r), clonado por W. Dynan a partir del pAI en el laboratorio del DR. R. Tjian de la Universidad de Berkeley, CA., E.U.A., quién lo obsequió al Dr. Patricio Garioglio de este Departamento. Este plásmido se propagó en la bacteria *Escherichia coli* cepa HB101 r^m-rec A⁻Amp^r.

El virus de la poliomielitis tipo I (Mahoney), pasaje 28 de su propagación en el laboratorio del Dr. Carlos Fernández-Tomás, fué obtenido del laboratorio del Dr. David Baltimore del Instituto Tecnológico de Massachusetts (M.I.T.), E.U.A..

Las células HeLa (derivadas de un carcinoma de cérvix uterino, CCL 2-ATCC, se adquirieron de la American Type Culture Collection (ATCC) y se propagaron en el laboratorio a una densidad de $3-6 \times 10^6$ células/ml.

a.2. Reactivos.

El Tritón X-100, Ditiotreitól (DTT), Hepes, Cloramfenicol, B-Mercaptoetanol, Tris-Base, Tris-HCl, Acido Bórico, Albúmina de Suero Bovino (BSA), Aminoácidos No Esenciales, Lisozima, Ampicilina, Glicina y Azul Brillante de Coomasie se obtuvieron de Sigma Chemicals Co. (E.U.A.).

El Azul de Bromofenol, Xileno de Cyanol, Bromuro de Etidio (EtBr), Fenol Ultrapuro, Persulfato de Amonio (PSA), Cloruro de Cesio (CsCl) y el TMED se obtuvieron de BRL (E.U.A.).

El Bicarbonato de Sodio (NaHCO_3), Fosfato de Sodio Monobásico Dihidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Acetona, Hidróxido de Sodio (NaOH), Cloruro de Sodio (NaCl), Isopropanol, Cloruro de Magnesio Heptahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Glicerol, Cloruro de Potasio (KCl), Fosfato de Sodio Dibásico (Na_2HPO_4), Fosfato de Potasio Monobásico (KH_2PO_4), Carbonato de Sodio (Na_2CO_3), Tartrato de Sodio y Potasio, Sulfato de Cobre Pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Metanol, Acido Clorhídrico, EDTA y el Acido Tricloroacético (TCA), fueron obtenidos de J.T. Baker (Mex Co.).

La Acrilamida, NN' Metilenbisacrilamida, Agarosa y el Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) se obtuvieron de BDH (E.U.A.).

La Bactotripton, Extracto de Levadura y Casaminoácidos fueron obtenidos de DIFCO (E.U.A.).

El Etanol Absoluto, Tolueno, Acetato de Sodio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), Acido Acético Glacial y el Reactivo de Fenol (Folín) fueron obtenidos de Merck (México).

La Urea y la Sacarosa recristalizadas se obtuvieron de Schwartz-Mann (E.U.A.).

La Penicilina G Potásica y el Sulfato de Estreptomicina fueron obtenidos de Farmacéuticos Lakeside (México).

El Floruro de Fenil Metil-Sulfonilo (PMSF) se obtuvo de Bethese (E.U.A.).

El PPD fué obtenido de Packard Co. (E.U.A.).

El precursor radioactivo Metionina^{35S} se obtuvo de Amersham (Inglaterra).

El Medio Mínimo Esencial (MEM) fué obtenido de GIBCO laboratories, Inc. (E.U.A.).

El Suero Fetal de Ternera se obtuvo de Biocel (México).

Las bolsas de diálisis se obtuvieron de Spectrum Medical Industries, Inc. (E.U.A.).

El papel Whatman 3 MM se obtuvo de Whatman (E.U.A.).

La Sepharosa 4B de Pharmacia Chemicals (E.U.A.).

Las enzimas de restricción Ava I y Bam HI de Biolabs (E.U.A.).

b. Composición y Preparación de las Soluciones.

En la preparación de todas las soluciones se empleó agua bidestilada. Se esterilizó por autoclave (EA) a 15 lb/cm² de presión a 120°C durante 20', por filtración (EF) a través de membranas Millipore HMPA (0.22 µM), se guardó a temperatura ambiente (TA), a 4°C (TF), o se congeló a -20°C (TC) como se señala en cada solución.

b.1. Obtención del DNA.

Medio Luria: 10 g de Bactotripton, 5 g de Extracto de Levadura, 10 g de NaCl y 1 ml de NaOH 2 N. Aforar a 1 lt (EA) y (TF).

Medio Super Broths: 33 g de Bactotripton, 20 g de Extracto de Levadura, 7.5 g de NaCl y 3.5 ml de NaOH 10 M. Aforar a un litro (EA) y (TF).

Solución I: 50 mM Glucosa, 10 mM de EDTA pH 8 y 25 mM de Tris-HCl pH 8 (EA) y (TF).

Solución II: 0.2 N de NaOH y SDS al 1% (EF) y (TF).

Solución III: 3 M de Acetato de Sodio pH 5, 24.48 g de NaC₂H₃O₂·3H₂O más 6.89 ml de Acido Acético Glacial. Aforar a 100 ml. El pH debe quedar a 5 (checarlo) (EA) y (TF).

Buffer T-E: 10 mM de Tris-HCl pH 7.4 y 1 mM de EDTA (EA) y (TF).

Isopropanol saturado con T-E/CsCl: preparar una solución de CsCl al 40% en buffer T-E. Saturar el isopropanol con esta solución.

Buffer Tris-Boratos (10X) : 89 mM de Tris-Base, 89 mM de Acido Bórico y 2.5 mM de EDTA. Checar que el pH sea de 8.3 (EA) y (TF).

Buffer de Columnas 500 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl pH 7.8 y 10 mM de EDTA (EA) y (TF).

Colorante Blue Juice (10X): Ficoll (tipo 400) 30%, EDTA 50 mM pH 8, Azul de Bromofenol al 0.25% y Xileno de Cianol al 0.25%.

Buffer Core (10X): 500 mM de Tris-HCl pH 8, 100 mM de MgCl₂ y 500 mM de NaCl.

Soluciones de Sacarosa al 5,10,20,50, y 60% para gradientes (w/v): la Sacarosa se disolvió en 20 mM de Tris-HCl pH 7.9, 20 mM de EDTA, 200 mM de NaCl y 0.1% de Sarkosyl (EA) y (TF).

b.2. Obtención de los Extractos Citoplasmáticos.

MFM (2X): Para un litro de medio mínimo esencial dos veces concentrado se disuelven dos sobres de medio liofilizado (GIBCO laboratories) en 900 ml de agua bidestilada estéril, se agregan 4 g de Bicarbonato de Sodio. El pH se ajusta a 7.4 con NaOH 1 M (EF) y (TF).

Solución de Aminoácidos no Esenciales (100X):

COMPONENTE	CONCENTRACION (mg/lit)
L-Alanina	890.00
L-Asparagina.H ₂ O	1500.00
L-Aspártico	1330.00
L-Acido glutámico	1470.00
L-Prolina	1150.00
L-Serina	1050.00
L-Glicina	750.00

Disolver en agua bidestilada. Ajustar a pH 7.3 y aforar a 1 litro (EF) y (TC).

Solución de Glutamina (100X): Para un litro, disolver 29.4 g de L-Glutamina en 900 ml de agua bidestilada, ajustar a pH 7.3 y aforar a 1 litro (EF) y (TC).

Solución de Metionina (100X): Para un litro disolver 1.5 g de L-Metionina en 900 ml de agua bidestilada, ajustar a pH 7.3 y aforar a 1 litro (EF) y (TC).

Solución de Penicilina-Estreptomicina (100X): Para un litro disolver 7.5×10^6 unidades de Penicilina G Potásica y 5 g de Estreptomicina en 900 ml de agua bidestilada, ajustar a pH 7.3 y aforar a 1 litro (EF) y (TC).

MEM (1X): Para 1 litro de medio mínimo esencial una vez concentrado se emplean 450 ml de MEM (2X) estéril, 20 ml de una Solución de Penicilina-Estreptomicina (100X), 100 ml de Suero Fetal de Ternera (Laboratorios Biocel México) y 10 ml de Solución de Aminoácidos no Esenciales (100X).

Medio de Infección: Es el medio mínimo esencial (MEM 1X) sin, Glutamina, Metionina, Penicilina, Estreptomicina y Suero (EF) y (TF).

Buffer Hipotónico: 10 mM Hapes, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$ y 3 mM de DTT. Ajustar el pH a 7.9 (EA) y (TF).

Buffer Hipertónico: 300 mM Hapes, 1400 mM KCl y 30 mM $MgCl_2$. Ajustar a pH 7.9 (EA) y (TF).

Buffer R: 50 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl y 0.2 mM de DTT. Ajustar a pH 7.9 (EA) y (TF).

Buffer PBS: Para 1 litro disolver 8.4 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.15 g de Na_2HPO_4 y 0.2 g KH_2PO_4 . El pH se ajusta a 7.4 (EA) y (TF).

Buffer Manley IV: 25 mM Hepes, 100 mM KCl, 12 mM MgCl_2 , 0.5 mM EDTA, 2 mM DTT y Glicerol al 17% (v/v). Ajustar el pH a 7.9 (EA) y (TF).

Bolsas de diálisis: Hervir las bolsas con Na_2CO_3 al 10% (w/v) y 10 mM de EDTA durante 15'. Lavarlas de 3 a 5 veces con agua bidestilada estéril. Repetir la operación 1 vez. Añadir 1 mM de EDTA (EA) y (TF) con 2 gotas de Cloroformo .

Soluciones A,B y C para cuantificación de proteínas:

Solución A: 94 mM de Na_2CO_3 , 50 mM de NaOH y 0.047 mM de Tartrato de Sodio y Potasio (TF).

Solución B: 2 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (TF).

Solución C : 50 partes de la solución A con 1 parte de la solución B. Se prepara fresca (TA).

Líquido de centelleo Tolueno-Tritón 1 litro de Tolueno, 60 ml de Tritón X-100, 168 ml de agua bidestilada y 3.3 g de PPO.

Azul de Coomasie: 2.0 g de Azul de Coomasie disueltos en Metanol 50%-Acido Acético 7%.

Salicilato de Sodio: 1 M de Acido Salicílico y 1 M de NaOH, mezclar todo al mismo tiempo en agua bidestilada.

M E T O D O S.

AISLAMIENTO DEL PLÁSMIDO PLAX POR MEDIO DE GRADIENTES DE CsCl (Birboim y Doly, 1979).

Una colonia de la bacteria Escherichia coli cepa HB101, transformada con el plásmido pLAX, se inoculó en 50 ml de medio Luria con ampicilina (50 mg/ml) y se dejó crecer a 37°C en agitación durante toda la noche. Al día siguiente parte del cultivo se diluyó 1:100, se diluyeron 10 ml del cultivo anterior en 1 litro de medio Super Broth con ampicilina (50 mg/ml) y se siguió la D.O. a 590 nm hasta que se obtuvo una lectura entre 0.5 y 0.6. En ese momento, se agregaron 100 mg de cloramfenicol (100 µg/ml), 10 ml de glucosa al 50% y 15 ml de casaminoácidos al 10%, dejándose amplificar el plásmido durante por lo menos 16 hs a 37°C en agitación constante. Posteriormente se sedimentaron las bacterias a 5,000 rpm durante 10' en el rotor G83 de la centrifuga Sorvall RC-58. El paquete celular se resuspendió en 25 ml de la Solución I y se agregó 50 mg de lisozima (2 mg/ml), la mezcla se dejó a 4°C durante 30', luego se agregaron 50 ml de la Solución II y se mezcló suavemente, dejándose 5' más a 4°C, enseguida se agregaron 37.5 ml de la solución III, se mezcló suavemente y se dejó otros 60'. La mezcla de lisis se distribuyó en 2 botellas "corex" de 150 ml, se centrifugó a 8,000 rpm durante 60' en el rotor GSA de la centrifuga Sorvall. Se recuperó el sobrenadante y éste se repartió en partes iguales en 4

botellas corex, y se agregó a cada una 3 volúmenes de etanol absoluto a -20°C . Se dejó precipitar el DNA durante toda la noche a -20°C . Después se centrifugó a 10,000 rpm a -20°C durante 30' en el rotor GSA de la Sorvall. Se desecharon los sobrenadantes y las pastillas se dejaron secar a temperatura ambiente, luego, éstas se resuspendieron en 30 ml de acetato de sodio 0.1 M pH 5, se añadieron 3 volúmenes de etanol absoluto a -20°C , se mezcló y se dejó precipitar el DNA durante 30' a -70°C , después se centrifugó a 10,000 rpm a -20°C durante 30'. Se desechó el sobrenadante y se repitió la operación anterior. Las pastillas secas se resuspendieron en 6 ml de buffer T-E con RNasa A (50 u/ml), incubando posteriormente a 37°C durante 30'. Al término de este tiempo la muestra se depositó en 2 tubos de polialómero del rotor 50 Ti, previamente hervidos en buffer T-E durante 15', y se agregó por tubo 4 ml de buffer T-E, 7 g de CsCl y 0.05 ml de una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml). Los tubos se sellaron y se introdujeron en el rotor 50 Ti, se centrifugaron a 45,000 rpm a 20°C durante 36 hs en la ultracentrífuga Beckman LB-55. Después de la corrida, los tubos se llevaron a un cuarto oscuro y se iluminaron con una lámpara de luz U.V. para detectar las bandas de DNA. Se observaron 2 bandas bien definidas, una superior que contenía el plásmido linearizado y con "nicks" y otra inferior que contenía el plásmido circularizado. Ambas bandas se colectaron por el extremo inferior del tubo, después de que a este se le hizo una punción con una aguja hipodérmica estéril. Por las características del plásmido se decidió trabajar con la banda inferior que se colectó. Este DNA se trató con isopropanol

saturado con CsCl/T-E , lo que permitió extraer el bromuro de etidio por eliminación del material coloreado. Finalmente, con el objeto de eliminar el CsCl de la muestra, ésta se dializó a 4°C contra buffer T-E durante toda la noche, haciéndose un cambio de buffer a la primera hora. El DNA se guardó a 4°C en un tubo de polialómero.

AISLAMIENTO DEL PLASMIDO pLAX POR MEDIO DE SEPHAROSA 4B.

El método es igual al anteriormente descrito, desde la inoculación de la cepa bacteriana transformada en medio Luria más ampicilina, hasta la obtención del lisado claro, es decir, hasta la recuperación del sobrenadante proveniente de la centrifugación de la mezcla de lisis a 8,000 rpm durante 60'; a partir de este paso el protocolo fué diferente. El sobrenadante se distribuyó en partes iguales en 2 botellas corex de 150 ml, se agregó 2 volúmenes de etanol absoluto y el DNA se dejó precipitar durante 30' a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 10,000 rpm durante 15' en el rotor GSA de la centrifuga Sorvall, se decantó el sobrenadante y las pastillas se dejaron secar a temperatura ambiente. Las pastillas se resuspendieron en 12.5 ml de buffer de columna. La muestra se depositó en un tubo de polialómero de 50 ml y se extrajo con un volúmen igual de fenol:cloroformo (1:1), después se centrifugó a 10,000 rpm durante 5' para separar las fases, se recuperó la fase acuosa y ésta se extrajo con volúmen igual de cloroformo, se volvió a centrifugar y nuevamente se recuperó la fase acuosa, luego se incubó brevemente a 68°C con el

fin de evaporar los residuos de cloroformo. Para eliminar el RNA de la muestra, ésta se incubó con RNAasa A (25 ug/ml) 60' a temperatura ambiente. Se realizó una extracción con fenol:cloroformo y otra más con cloroformo, luego la muestra se depositó en un tubo corex de 30 ml, se ajustó a 0.1 M de NaCl, se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto y se dejó precipitar el DNA durante 30' a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 20' en el rotor SS 34 de la centrífuga Sorvall, se decantó el sobrenadante, la pastilla se dejó secar y luego se resuspendió en 2.5 ml de buffer de columna. La solución con el DNA se hizo pasar por una columna de Sepharosa 4B de d=1cm y h=20cm. El DNA se eluyó en alícuotas de 1 ml. Para la elución se empleó buffer de columna. Por cada ml de DNA se colectaron 20 fracciones de 0.5 ml en tubos de polipropileno de 1.5 ml. Posteriormente se lavó la columna con el mismo buffer y se repitió la operación. Cuando se concluyó la elución se tomó una alícuota de cada fracción y se corrieron minigeles de agarosa al 1% para determinar qué fracciones contenían el plásmido, las fracciones de interés se juntaron y el DNA se precipitó con NaCl 0.1 M y 2 volúmenes de etanol absoluto durante 30' a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 10,000 rpm durante 20', se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. El DNA se resuspendió en 1 ml de buffer T-E y se guardó en un tubo de polipropileno a 4°C.

DETERMINACION DE LA PUREZA DEL DNA.

Para determinar la pureza del DNA se tomó una alícuota de la preparación y se efectuó una dilución 1:100 en buffer T-E, posteriormente se leyó la muestra en un espectrofotómetro a 280 nm y a 260 nm. El parámetro que se consideró indicador de una pureza aceptable fué el cociente D.O. $260/280 = 2.0-1.8$.

CUANTIFICACION DEL DNA.

La concentración del DNA aislado se determinó por comparación con un DNA de concentración conocida. El DNA que sirvió como patrón de referencia, fué el DNA del bacteriófago Lambda cortado con la enzima Hind III a una concentración de 2 uq/ul (Laboratories Riolabs). Se realizaron 10 diluciones de ambos tipos de DNA en tubos Eppendorf de 0.5 ml. Posteriormente, cada dilución se depositó suavemente y en orden decreciente, sobre una placa de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0.5 uq/ul). Después de esto, la placa se guardó en oscuridad y a temperatura ambiente 45'. Una vez que las muestras se secaron, la placa se visualizó en un transiluminador de luz U.V. y se determinó que diluciones del DNA control y del problema eran equivalentes, de ésta manera se determinó la concentración del DNA purificado.

DETECCION DEL DNA POR MEDIO DE PLACAS DE AGAROSA AL 1%.

Para preparar las placas, se disolvió 1 g de agarosa en 100 ml de buffer Tris-Boratos 1X a 70-80°C, posteriormente se agregó bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 ug/ml. La solución se repartió en partes iguales en 4 cajas de petri de plástico de d=10 cm y se dejó gelificar a temperatura ambiente. Las placas que no se utilizaron de inmediato, se envolvieron en papel aluminio y se guardaron a 4°C. Para detectar el DNA, se depositó con cuidado sobre una placa de agarosa, 5 ul de cada muestra que se quería analizar, luego se guardó la placa en oscuridad 45' a temperatura ambiente, cuando se secaron las muestras la placa se visualizó en un transiluminador de luz U.V. y se determinó presencia o ausencia de DNA en las muestras analizadas, por ausencia o presencia de fluorescencia.

RESTRICCION DEL PLASMIDO PLAX CON LAS ENZIMAS AVA I Y BAM HI.

Para probar la actividad de las enzimas que se utilizaron, se efectuaron minirestricciones en tubos eppendorf de 1.5 ml, a 4 ul de DNA de pLAX (0.25 ug/ul), se le agregaron 14 ul de agua bidestilada estéril, 2 ul de buffer de restricción "core" 10X, 1 ul de la enzima Ava I (4 unidades/ul) y 1 ul de la enzima Bam HI (16 unidades/ul). La mezcla de restricción se dejó incubar 1 h a 37°C. La reacción se detuvo calentando la muestra a 65°C durante

5'.

La restricción de cantidades mayores de DNA se llevó a cabo guardando las proporciones con el protocolo anterior, por ejemplo, a 120 ul de DNA pLAX (0.25 ug/ul) se le añadieron 60 ul de agua bidestilada estéril, 20 ul de buffer "core" 10X, 8 ul de Ava I (4 unidades /ul) y 2 ul de Bam HI (16 ul/ul). La mezcla se dejó incubar durante 6 hs a 37°C debido a que a diferencia de las minirestricciones, se añadió una unidad de cada enzima por ug de DNA. La digestión del DNA se paró calentando la muestra a 65°C durante 5'.

ANÁLISIS DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN EN MINIGEL DE AGAROSA AL 1%.

Los minigeles de agarosa se prepararon de la siguiente manera: se disolvieron 0.2 g de agarosa en 20 ml de buffer Tris-Boratos 1X a 70-80°C, la solución se depositó en una cámara para minigel, se introdujo un peine formador de carriles y se dejó gelificar. Posteriormente se retiró el peine y se llenó la minicámara con buffer Tris-Boratos 0.5X.

Las muestras se ajustaron a un volúmen de 20 ul con agua bidestilada estéril, se les añadió 2 ul de colorante "Blue Juice" y se depositaron en los pozos del gel. Los minigeles se corrieron a 100 voltios, con el polo negativo conectado en la parte anterior de la cámara y el polo positivo en la parte posterior, hasta que el Xileno de Cianol llegó al extremo positivo del gel.

Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (5.0 ug/ml) durante 10'. Las bandas de DNA se visualizaron en un transiluminador de luz U.V.. Las fotografías se tomaron con una cámara Polaroid MP-4, usando Película Polaroid.

SEPARACION DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN EN GRADIENTES LINEALES DE SACAROSA DE 5 A 20%.

La digestión del plásmido pLAX de 4880 pares de bases con las enzimas Ava I y Bam HI, generó 2 tipos de fragmentos, fragmentos de 3312 p.b. y fragmentos de 1568 p.b. que contenían el PMT-Adeno-2. Con el objeto de separar ambas poblaciones y purificar los fragmentos de 1568 p.b., la solución de DNA ya restringida se introdujo en gradientes lineales de sacarosa de 5 a 20% que se prepararon con un formador de gradientes, en lado izquierdo del formador, se depositaron 5 ml de sacarosa al 5% y en lado derecho 5 ml de sacarosa al 20%, los gradientes se depositaron en tubos de polialómero del rotor SW 40, previamente hervidos en amortiguador T-E y que contenían un colchón de sacarosa al 50% de 635 ul. Se depositó por gradiente 0.545 ml de plásmido digerido, los gradientes se centrifugaron a 35,000 rpm a 20°C durante 12 hs en el rotor SW 40 de la ultracentrifuga Beckman L8-55. Después de la corrida los gradientes se fraccionaron por la parte superior de los tubos, con una micropipeta Gilson, se tomaron fracciones de 100 ul.

Para determinar que fracciones contenían DNA, se tomó una

alícuota de 5 ul de cada fracción y se analizó en placas de agarosa al 1%, ya seleccionadas las fracciones que contenían DNA, se tomó una alícuota de 5 ul de cada una de ellas y se corrieron miniguels de agarosa al 1%. Se juntaron, por un lado las fracciones que contenían los fragmentos de 1568 p.b., y por otro lado las fracciones que contenían ambos tipos de fragmentos, las muestras se diluyeron 2 veces con buffer T-E, el DNA se precipitó con acetato de sodio 0.15 M pH 5 y 2 volúmenes de etanol absoluto a 20°C durante toda la noche. Finalmente se centrifugó a 10,000 rpm durante 30', se decantó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla y el DNA se resuspendió en buffer T-E y se guardó a 4°C.

SEPARACION DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN EN GRADIENTES LINEALES DE SACAROSA DE 10 A 50% de 4 ml.

Los fragmentos generados por la restricción del plásmido pLAX con las enzimas Ava I y Bam HI, también se separaron en gradientes lineales de sacarosa de 10 a 50%. Para preparar cada gradiente se depositaron en el lado izquierdo del formador de gradientes 1.8 ml de sacarosa al 10% y en el lado derecho 1.8 ml de sacarosa al 50%. Los gradientes se depositaron en tubos de polialómero del rotor SW 50.1 que contenían un colchón de sacarosa al 60% de 235 ul, los tubos se hirvieron previamente durante 15' en buffer T-E. Se depositó en cada gradiente 200 ul de DNA digerido. Los gradientes se centrifugaron a 40,000 rpm a 20°C durante 12 hs en el rotor SW 50.1 en la Ultracentrífuga

Beckman LB-55. Después de la corrida, los gradientes se procesaron de igual manera que en el protocolo anterior.

CULTIVO DE CELULAS HELA EN SUSPENSIÓN.

Cultivos de células HeLa en suspensión de 100 ml o más se obtuvieron a partir de 50 ml de un cultivo stock de células HeLa S-3. De acuerdo al volumen del cultivo que se iba teniendo, las células se crecieron en matraces erlenmeyer de 250 o 500 ml, así como en matraces esféricos de 500 ml o 1 lt, utilizando según el caso, poco menos de la mitad del volumen que podían contener. Las células se alimentaron cada 24 hs, con MEM 1X suplementado con suero fetal de ternera, aminoácidos no esenciales y antibióticos, se les mantuvo a una densidad de $4-8 \times 10^6$ células/ml. El número de células se determinó tomando una alícuota del cultivo y determinando su concentración en un hematímetro. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en agitación constante.

**INFECCION DE CELULAS HELA CON EL VIRUS DE LA POLIOMIELITIS
(Baltimore y cols., 1966).**

Se crecieron células HeLa en suspensión como se describió anteriormente. Las células se empastillaron centrifugándolas a 1500 rpm durante 5' en la centrifuqa Universal PR600. El paquete celular se lavó con MEM de infección (sin suero, metionina, glutamina ni antibióticos) y luego se resuspendió en este mismo medio para dejar las células a una concentración de 10^7 células/ml. El volúmen de células concentradas se dividió en dos, una parte se infectó con Poliovirus y otra no, con ésta última parte se realizó una "infección fingida" o control, es decir, se procesó de igual manera pero no se añadió el virus. A las células que se decidió infectar, se les adicionó el virus, haciendo previamente el cálculo para una multiplicidad de infección (m.d.i.) de 100 unidades formadoras de placa (u.f.p.) por célula. Para permitir la adsorción del virus, tanto el cultivo infectado como el control, se dejaron en agitación constante durante 30' a temperatura ambiente. Después de este tiempo ambos cultivos se diluyeron a 5×10^6 células/ml con MEM de infección, dejando seguir la adsorción durante 15' más en agitación a la misma temperatura. Las células posteriormente, se sedimentaron a 1500 rpm durante 5', los paquetes celulares se resuspendieron en MEM de infección suplementado con 2% de suero dializado (vs. medio de infección) y glutamina 1X a una concentración de 5×10^6 células/ml. Inmediatamente se colocaron ambas suspensiones celulares a 37°C, con agitación suave y

continua, este punto correspondió al tiempo cero de infección.

MARCAJE DE CELULAS HELA CON METIONINA^{35S} DURANTE LA INFECCION CON EL VIRUS DE POLIOMIELITIS.

A las 2 1/2 hs post infección células Hela infectadas y no infectadas, se marcaron con 25 a 50 uCi/ml de Metionina^{35S} durante 60' (3 1/2 hs post infección). Para cesar la incorporación del aminoácido radioactivo se adicionó metionina fría a una concentración final de 5X, y se colocaron las suspensiones celulares en hielo durante 5', luego se centrifugaron a 1500 rpm durante 5' en la centrífuga Universal, para continuar con el protocolo de obtención de extractos citoplasmáticos.

MONITOREO DE LA INFECCION.

La velocidad aparente de síntesis de proteína en células Hela control e infectadas, se midió desde las 2 1/2 a las 3 1/2 hs post infección, durante el marcaje de las células con Metionina^{35S}, para ello se realizó un "piloto de infección", es decir, durante el marcaje se monitoreó la incorporación del isótopo radioactivo en ambos cultivos celulares. Desde el tiempo cero de infección, cada 15', se tomaron por duplicado, alícuotas de 45 ul de cada cultivo y se mezclaron con 5 ul de metionina fría 100X, enseguida se depositaron en papeles filtro Whatman 3

MM y se les agregó 45 μ l de TCA 10%. Al concluir el piloto de infección los papeles se dejaron secando a temperatura ambiente, una vez que se secaron, se lavaron con TCA 5%, se hizo un lavado de 10' y otro de 5', luego se lavaron 2 veces con etanol 30% durante 15' y se pusieron a secar. Cuando se secaron los papeles, cada uno de ellos se depositó en viales que contenían 5 ml de líquido de centelleo y se les midió su radioactividad en un espectrofotómetro Packard modelo 3385.

OBTENCION DE EXTRACTOS CITOPASMATICOS A PARTIR DE CELULAS HELA (Weil y cols.,1979).

Después de que las células HeLa control e infectadas con Poliovirus se marcaron con Metionina^{35S}, se procedió a obtener los extractos citoplasmáticos de ambos cultivos. Todo el procedimiento se realizó a 4°C.

Una vez que se detuvo la incorporación de Metionina^{35S} en las células, estas se empastillaron a 1500 rpm durante 5' en la centrifuga Universal PR 600, el paquete celular se lavó con PBS y las células se volvieron a sedimentar a 1500 rpm durante 7', posteriormente se lavaron con buffer hipotónico y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5'. Las células se resuspendieron en 2 volúmenes (en relación a la pastilla) de buffer hipotónico, agregándose PMSF para dejar una concentración final de 0.18 mM. Las células se dejaron incubando durante 10' en este buffer. Después de este tiempo ambas suspensiones se

homogenizaron por separado, en homogenizadores metálicos preenfriados a 4°C con 7 golpes suaves, agregándose inmediatamente 0.1 V de buffer hipertónico (en relación al buffer hipotónico antes adicionado) para luego dar 2 golpes suaves más. Se checó la ruptura de las células al microscopio. Cada homogenizado se depositó sobre un colchón de glicerol al 30% en buffer R' de 6-8 ml, y se centrifugó a 3,200 rpm durante 10' en la centrífuga Universal. Se recuperó de la parte superior un volúmen igual al depositado sobre cada colchón, volúmen correspondiente a los extractos citoplasmáticos de las células. Finalmente los extractos se dializaron vs Buffer Manley IV (1:100) a 4°C durante toda la noche. Posteriormente los extractos se alicuotaron y se guardaron en nitrógeno líquido.

ANALISIS DE MEZCLAS DE TRANSCRIPCION "IN VITRO" EN GRADIENTES LINEALES DE SACAROSA DE 10 a 50%.

Se prepararon mezclas de DNA-proteína en condiciones de transcripción "in vitro". Las condiciones de reacción fueron: Hepes 12 mM pH 7.9, KCl 60 mM, MgCl₂ 7 mM, EDTA 0.3 mM, DTT 1.2 mM, Glicerol 10.2%; temperatura de reacción 30°C; tiempo de reacción 60'; volúmen final de reacción 25 o 50 ul; la cantidad de DNA así como la cantidad de extracto citoplasmático (marcado con Metionina^{35S}) se indica en cada experimento.

Las mezclas de transcripción "in vitro" se depositaron sobre gradientes lineales de sacarosa de 4 ml de 10 a 50% con un colchón de 60%. Los gradientes se centrifugaron de 10 a 12 hs a 40,000 rpm a 20°C en el rotor SW 50.1 de la Ultracentrifuga Beckman L8-55. Después de la corrida los gradientes se colectaron en fracciones de 100 ul y se procedió a analizarlos.

Primeramente se determinó el perfil radioactivo obtenido en cada gradiente, se tomaron alícuotas 5 a 20 ul de cada fracción del gradiente y cada una de ellas se depositó en un vial conteniendo 5 ml de líquido de centelleo Tolueno-Tritón. Los viales se metieron a contar en un contador de centelleo utilizando el canal de ^{14}C .

Para determinar la distribución del DNA a lo largo de los gradientes, en base a los picos de radioactividad registrados se formaron grupos de fracciones. De cada grupo de fracciones se tomó una alícuota, la muestra se ajustó a 0.15 M de acetato de sodio pH 5 y se agregaron 3 volúmenes de etanol absoluto, el DNA se dejó precipitar a -20°C durante toda la noche, luego se centrifugó a 10,000 rpm durante 30', los precipitados se resuspendieron en Buffer T-F y posteriormente se realizó una electroforesis en minigel de agarosa al 1%.

Una vez definidos los grupos de fracciones que contenían DNA (fragmentos de 1568 p.b. conteniendo el PMT-Adeno-2) se procedió a identificar las proteínas presentes en cada uno de ellos, para este efecto cada muestra se liofilizó por separado y posteriormente se realizó una electroforesis en gel de acrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS 0.1%).

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA (Lowry,1951).

Añadir 1 ml de Solución C a 0.2 ml de muestra por duplicado y agitar bien. Dejar 10' exactos y añadir 0.1 ml de Reactivo de Fenol (Folín diluido 1:1 con agua), mezclar bien inmediatamente. Dejar al menos 45' para que se desarrolle el color. Leer las muestras a D.O. 660 nm. Usar agua como blanco y una solución de albúmina de suero bovino para hacer la curva patrón.

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS.

Geles de poliacrilamida al 10% se corrieron en el sistema de amortiguadores de Laemmli (1970). Amortiguador de muestra que contiene Tris-HCl 0.06 M pH 6.5, SDS 2%, Glicerol 5%, B-Mercaptoetanol 5% y pironina al 0.001%.

Después de la electroforesis, los geles se tñeron durante 30 minutos con Azul de Coomassie, se destñeron con una mezcla de Metanol 50%-Acido Acético 10% y posteriormente fueron sometidos a fluorografía antes de ser secados y expuestos a autorradiografía. La autorradiografía se realizó colocando una placa de rayos X (Kodak X-Omat) entre el gel seco y las placas intensificadoras de un Cassete (Kodak C-1), colocándolo posteriormente a -70°C durante tiempo variable de acuerdo a las C.p.m..

FLUOROGRAFIA

Después de la corrida, teñir el gel de poliacrilamida con Azul de Coomassie durante 30 minutos, desteñir el gel con Metanol 50%-Acético10%. Lavar el gel con agua bidestilada 3 veces, dejando en agitación 30 minutos cada vez. Eliminar el agua y agregar una solución de Salicilato de Sodio 1 M pH 6.0 y dejar 30 minutos en agitación. Eliminar el Salicilato y agregar una solución de Glicerol al 1% y enjuagar el gel con ésta solución. Secar el gel y exponer a autorradiografía.

R E S U L T A D O S

La primera parte del presente trabajo consistió en la obtención de los materiales y la determinación de las condiciones de experimentación.

OBTENCION DEL DNA.

En los sistemas de transcripción "in vitro" (Weil y cols.,1979; Manley y cols.,1980) se ha utilizado fundamentalmente como templado de DNA exógeno, la unidad de transcripción tardía de Adenovirus-2, debido a que ésta posee un promotor fuerte y a que utiliza los factores de la célula hospedera para su transcripción (Wallace y Kates,1972).

Fragmentos de la unidad de transcripción tardía de Adenovirus-2 conteniendo el promotor han sido clonados en pBR322. La utilidad de estos plásmidos radica en que a partir de ellos mediante enzimas de restricción, es posible obtener templados de DNA de longitud definida, que al ser ensayados en un sistema de transcripción "in vitro", generan un transcrito específico que puede ser monitoreado y cuantificado, permitiendo estudios cuantitativos de la iniciación exacta de la transcripción.

El plásmido pLAX (obsequio del Dr. Tjian, Berkeley,Cal.) es el resultado de la clonación en pBR322, de un fragmento de la unidad de transcripción tardía de Adenovirus-2, que va de la región 15.5 a 18.5 u, en el cual se encuentra contenido el

promotor, ver Figura No.2.

El primer paso desarrollado en la elaboración de este trabajo, fué la propaación y el aislamiento del plásmido pLAX.

Para aislar el plásmido pLAX, se utilizaron 2 diferentes métodos, a través de gradientes de CsCl y a través de cromatografía en Sepharosa 4B, (ver Sección de Métodos).

Brevemente, partir de una colonia de la bacteria Escherichia coli cepa HB101, transformada con el plásmido pLAX, se obtuvo un cultivo de 1 litro. Se amplificó el plásmido con cloramfenicol, y posteriormente se obtuvo un lisado claro, a partir del cual se recuperó el DNA por precipitación con etanol-acetato de sodio; siguiendo el método de gradientes de CsCl, se aislaron 2.7 mg de plásmido, y siguiendo el método de cromatografía en Sepharosa 4B, se aislaron 1.8 mg de plásmido, la ventaja de éste último método es de que no se requiere de ultracentrifugación.

Para determinar la pureza del DNA aislado se determinó el cociente de absorbancia A_{260}/A_{280} que resultó ser de 1.9. Un valor de 2.0 corresponde al 100% de pureza de ácido nucléico, por lo que una preparación con un cociente entre 2.0 y 1.8 se considera suficientemente limpia para trabajar.

El DNA se cuantificó como se indica en la sección de Materiales y Métodos y se procedió a caracterizarlo.

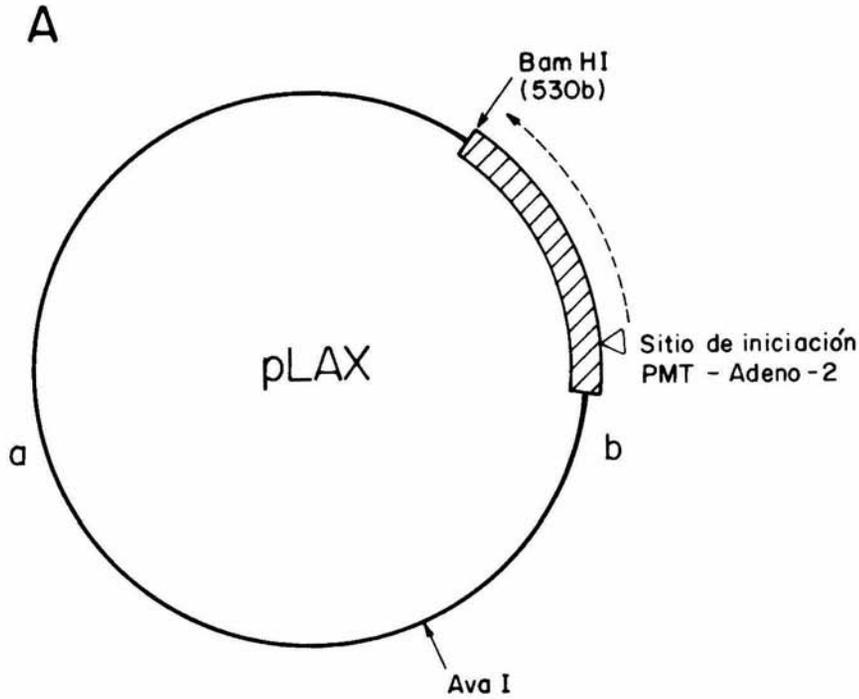
CARACTERIZACION DEL DNA.

Para comprobar que el plásmido propagado y aislado, era el mismo que el proporcionado por el Dr. Tjian, se procedió a comparar el patrón de restricción de ambos plásmidos usando las enzimas de restricción *Ava*I y *Ram* HI en minigel de agarosa al 1%, ver Figura No.2.

La restricción del plásmido pLAX de 4880 p.b. con las enzimas *Ava* I y *Ram* HI, genera 2 tipos de fragmentos: a) fragmentos de 1568 p.b. que contienen el DNA de Adenovirus-2 clonado, conteniendo el promotor tardío y b) fragmentos de 3312 p.b. que contienen el DNA del vector pBR322.

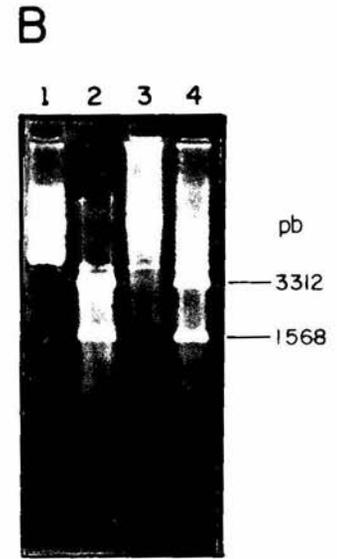
Como se puede apreciar en la Figura No.2, los fragmentos de restricción tanto del plásmido original (carril 4) como los del aislado (carril 2) son idénticos y del tamaño esperado.

Las diferencias que se visualizan en el patrón electroforético entre el plásmido original (carril 3) y el aislado (carril 1) sin restringir, son debidas al procedimiento de aislamiento de ambos plásmidos. El plásmido original fué introducido en la bacteria Escherichia coli cepa HB101 y posteriormente propagado y aislado a través del método de gradientes de CsCl, mientras que el propagado por nosotros fué aislado a través del método de cromatografía en Sepharosa 4B, ver Figura No.2.



Restricción : Ava I
4480pb

Ava I - BamHI
a - 3312pb
b - 1568pb



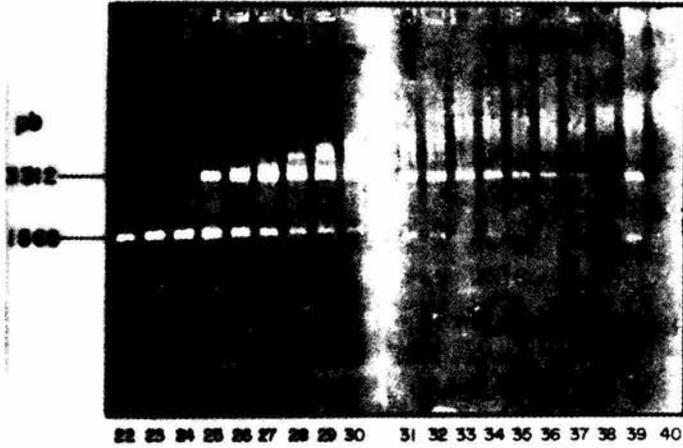
En el carril 1 se puede observar una banda inferior que corresponde a la forma superhelicoidal del plásmido, posteriormente hacia arriba, otra banda que corresponde a la forma circular y finalmente 2 bandas que corresponden a concatámeros de la forma superhelicoidal.

SEPARACION DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCION EN GRADIENTES LINEALES DE SACAROSA

Para aislar los fragmentos de 1568 p.b. (conteniendo el PMT-Adeno-2), y con estos poder realizar las mezclas de DNA-proteína-Metionina^{35S}, se emplearon gradientes lineales de sacarosa de 5 a 20% (ver Métodos).

Posteriormente con la finalidad de poder aislar el posible complejo DNA-proteína, formado después de la incubación en condiciones de transcripción "in vitro", se determinaron las condiciones en que los fragmentos de 1568 p.b., podían ser sedimentados en gradientes lineales de sacarosa de menor volúmen con fines analíticos.

Se determinó que los fragmentos de restricción podían ser separados en gradientes lineales de sacarosa de 4 ml de 10 a 50%, si estos se centrifugaban a 285,000g durante 12 hs a 20°C (ver Métodos). En la figura No.3, puede observarse el patrón de sedimentación de los fragmentos de restricción dentro de este tipo de gradientes.



22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40

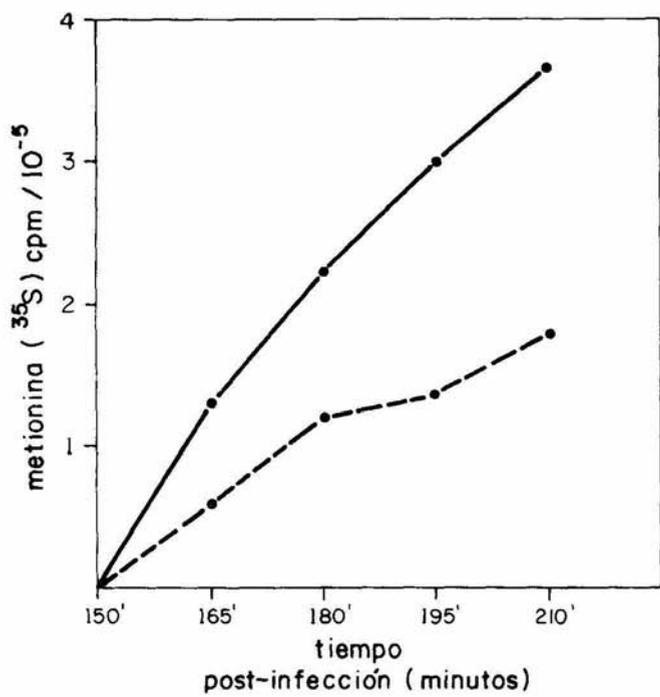
Fracción

INFECCION DE CELULAS HELA CON EL VIRUS DE LA POLIOMIELITIS.

Se infectaron células Hela con el virus de la Poliomielitis y un cultivo paralelo se sometió a "infección fingida" o control tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

De las 2 1/2 a las 3 1/2 hs post infección ambos cultivos se marcaron con 20 o 50 uCi/ml de Metionina³⁵S. Para determinar si se había llevado a cabo la infección se realizó un monitoreo de la misma, (ver Métodos).

En la Figura No.4 se muestran las determinaciones de incorporación de Metionina³⁵S a material TCA precipitable, a distintos tiempos durante la infección. Como puede observarse, la velocidad aparente de síntesis protéica en las células infectadas se encuentra abatida en cerca del 50% en relación a la observada en las células control, este resultado concuerda con la información ya reportada en relación a la inhibición de la síntesis de proteína celular inducida por Poliovirus (Levintow,1974), y por otra parte confirmó que la infección se había llevado a cabo.



OBTENCION DE EXTRACTOS CITOPLASMATICOS DE CELULAS HELA.

A partir de células HeLa infectadas con Poliovirus y de células HeLa sometidas a "infección fingida" o control, que habían sido marcadas con Metionina^{35S} de las 2 1/2 a las 3 1/2 hs post infección, se obtuvieron extractos citoplasmáticos empleando el método reportado por Weil (1979) descrito en la sección de Materiales y Métodos.

Los extractos se dializaron toda la noche vs Buffer de transcripción Manley IV y se guardaron a -70°C en nitrógeno líquido.

CARACTERIZACION DE LOS EXTRACTOS CITOPLASMATICOS.

En la Tabla No.1 estan indicadas las características de diferentes preparaciones de extractos citoplasmáticos obtenidos de células HeLa bajo "infección fingida" (control) y de células HeLa infectadas con Poliovirus, marcadas con Metionina^{35S} de las 2 1/2 a las 3 1/2 hs post infección.

La cantidad de proteína por μ l de extracto se determinó por el método de Lowry, la radioactividad por μ l de extracto se cuantificó como c.p.m. provenientes de proteína TCA precipitable (ver Métodos).

Como puede observarse en la Tabla No.1, los extractos citoplasmáticos Control e Infectado que tienen el No.3, fueron los que tuvieron mayor actividad específica, y ello se debió a

T A B L A N o. 1

ACTIVIDAD ESPECIFICA EN PROTEINAS TOTALES DE EXTRACTOS
CITOPLASMATICOS OBTENIDOS DE CELULAS HELA INFECTADAS CON EL VIRUS
DE LA POLIOMIELITIS.

Extracto Citoplasmático uq/ul ⁽¹⁾	c.p.m. ⁽²⁾	AE cpm/ug ⁽³⁾
Control 1	6.83	4486
Infectedo 1	4.07	2414
Control 2	3.18	1684
Infectedo 2	4.38	1861
Control 3	6.00	53128
Infectedo 3	4.50	20854

El No. de extracto citoplasmático se refiere al orden de preparación. Todos los extractos fueron obtenidos a las 3 1/2 hs post infección.

Los extractos con el No.1 y el No.2, se obtuvieron de células HeLa marcadas con 20 uCi de Metionina³⁵S/ml, los extractos con el No.3, se obtuvieron a partir de cultivos de células HeLa marcadas con 50 uCi de Metionina³⁵S/ml. En todos los casos el marcaje se realizó de las 2 1/2 a las 3 1/2 hs post infección.

(1) La proteína de los diferentes extractos expresada como uq/ul se cuantificó por el Método de Lowry. (2) La radioactividad de los extractos citoplasmáticos se cuantificó como c.p.m. provenientes de material ácido-insoluble, ver Sección de Materiales y Métodos. (3) AE= Actividad específica.

que, estos extractos se obtuvieron de cultivos de células HeLa que se marcaron con 50 uCi de Metionina³⁵S/ml. El resto de los extractos se obtuvieron de cultivos de células HeLa que se marcaron con 20 uCi de Metionina³⁵S/ml.

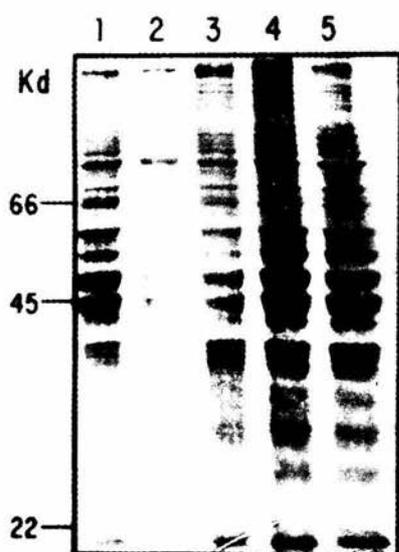
Para determinar la condición de los extractos así como su composición polipeptídica, se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes en acrilamida al 10% con SDS al 0.1%. Las muestras de cada extracto se redujeron con R-mercaptopetanol al 5% y se hirvieron durante 3'.

En la Figura No.5 Panel A se puede observar el gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie, como puede verse el patrón de proteínas de los diferentes extractos es muy semejante, como era de esperarse, ya que se trata de extractos citoplasmáticos provenientes de la misma línea celular, y a que en estas condiciones no es posible detectar las proteínas de síntesis reciente como lo son las virales.

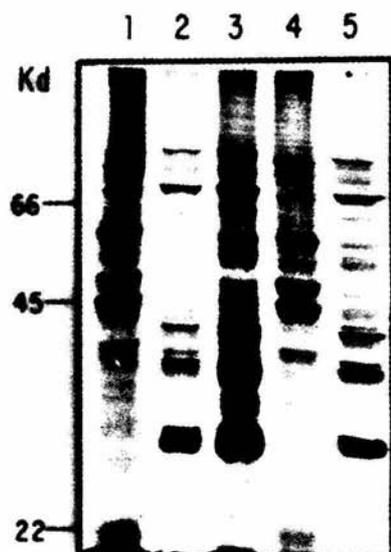
Ya que el aminoácido radioactivo Metionina³⁵S se había incorporado únicamente en las proteínas recién sintetizadas, la exposición en autorradiografía del mismo gel, Figura No.5 Panel B, permitió visualizar las proteínas que se sintetizan en las células HeLa en condiciones normales y en células HeLa que han sido infectadas con el virus de la poliomielitis, como podrá observarse, existen grandes diferencias entre los extractos citoplasmáticos obtenidos de células control y los obtenidos de células infectadas.

En las células HeLa infectadas con Poliovirus, alrededor de las 3 hs post infección la mayor parte de las proteínas recién

A



B



sintetizadas son específicas del virus, ocurriendo simultáneamente, una inhibición cada vez más acentuada de la síntesis protéica del hospedero.

ANÁLISIS EN GRADIENTES LINEALES DE SACAROSA DE MEZCLAS DE TRANSCRIPCIÓN "IN VITRO".

Una vez que se obtuvieron los materiales y se definieron las condiciones de ensayo, los objetivos del presente trabajo se abordaron de manera directa.

La estrategia general consistió en la preparación de mezclas de DNA (fragmentos de 156R p.b. conteniendo el PMT-Adeno-2) - proteína (extracto citoplasmático marcado con Metionina³⁵S, control o infectado), en condiciones de transcripción "in vitro", que se introdujeron en gradientes lineales de sacarosa de 10 a 50%, los cuales se fraccionaron y se analizaron tal cual se describe detalladamente en la sección de Métodos.

Antes de realizar el experimento que nos permitió identificar la proteína Metionina³⁵S asociada a los fragmentos de 156R p.b., se realizaron varios experimentos similares, todos los cuales sugerían asociación de proteína Metionina³⁵S a este DNA. La sugerencia provenía del hecho, de que en aquellos gradientes de sacarosa donde se habían colorado mezclas de transcripción "in vitro", aparecían picos radioactivos en la zona donde sedimentaban los fragmentos de 156R p.b., que no aparecían en los gradientes de sacarosa control, donde únicamente se había colocado extracto citoplasmático infectado Metionina³⁵S.

El experimento que a continuación se describe, corresponde a aquél que nos permitió realizar un análisis completo de los gradientes de sacarosa donde se colocaron las mezclas de DNA (fragmentos de 1568 p.b. conteniendo el PMT-Adeno-2) y extracto citoplasmático Metionina^{35S} control o infectado.

Con la finalidad de solucionar el inconveniente de no recuperar la suficiente muestra radioactiva para ser analizada en electroforesis, se decidió incubar una mayor cantidad de fragmentos de 1568 p.b. (conteniendo el PMT-Adeno-2) 1.5 ug en lugar de 0.5 ug, utilizado en los experimentos anteriores, y extractos citoplasmáticos Metionina^{35S} con una mayor actividad radioactiva por ul, para ello el cultivo de células Hela bajo "infección fincida" (control) y el de células Hela infectadas con el virus de la poliomielitis se marcaron de las 2 1/2 a las 3 1/2 hs post infección con 50 uCi de Metionina^{35S}/ml y no con 20 uCi/ml como se había hecho en la obtención de anteriores extractos.

Se prepararon las siguientes mezclas en condiciones de transcripción "in vitro" (ver Métodos), las cuales se incubaron a 30°C durante 60'. Las mezclas se colocaron en gradientes lineales de sacarosa de 10 a 50% con un colchón de 60% (ver Métodos). Con la finalidad de explicar con mayor claridad los resultados de este experimento se indica el nombre que recibió cada gradiente:

1) Gradiente Problema :

1.5 ug de DNA (fragmentos de 1568 p.b. conteniendo el
PMT-Adeno-2) con

100 ug de extracto citoplasmático infectado Metionina^{35S}

2) Gradiente Control No.1 :

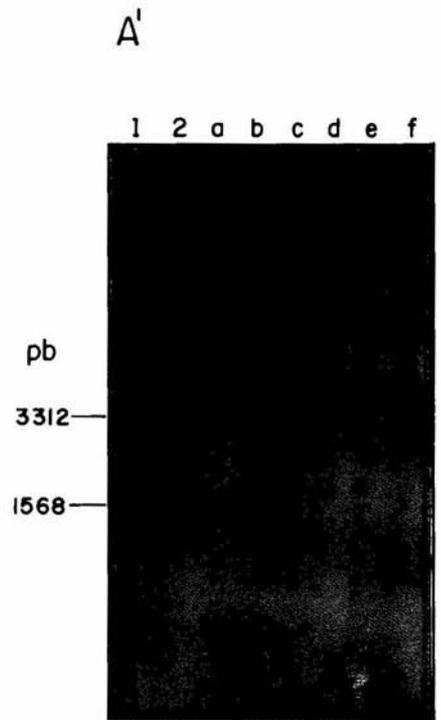
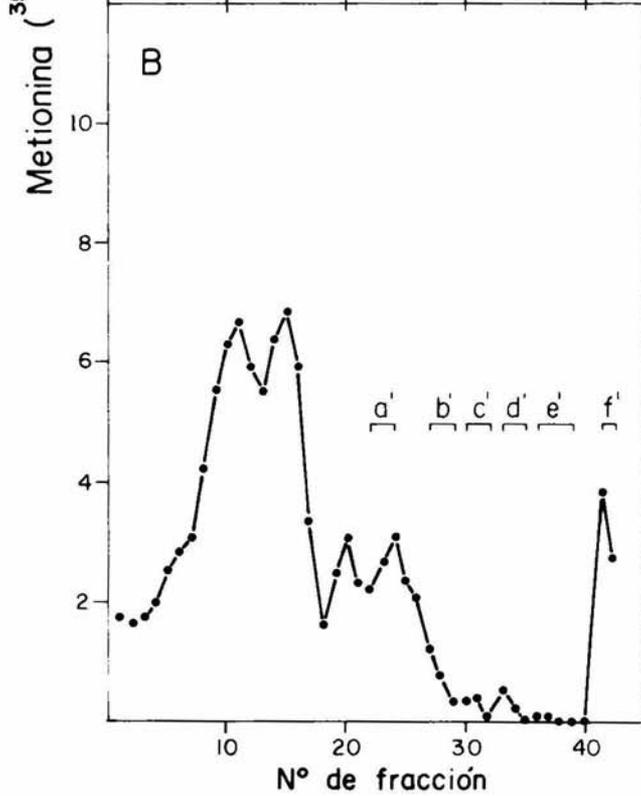
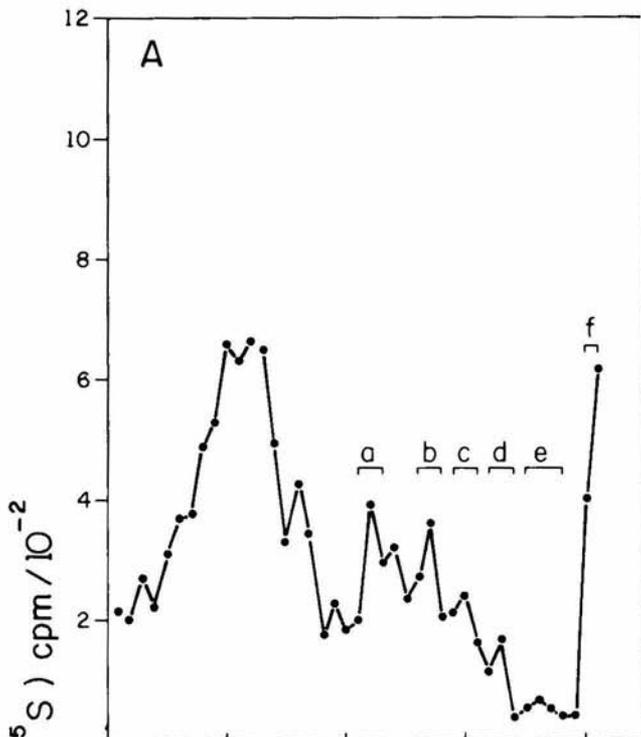
100 ug de extracto citoplasmático infectado-Metionina^{35S}

3) Gradiente Control No.2 :

1.5 ug de DNA (fragmentos de 1568 p.b. conteniendo el
PMT-Adeno-2) con

100 ug de extracto citoplasmático control-Metionina^{35S}

Los resultados de este experimento pueden apreciarse en las Figuras 6 y 7. Si se comparan los perfiles radioactivos obtenidos a partir del gradiente "problema" y del gradiente "control No.1" (Figura No. 6 Panel A y B), se podrá observar que en el primero aparecen 3 fracciones radioactivas "b", "c" y "d" que no aparecen en el gradiente control No.1, y que el pico radioactivo "a" se encuentra más acentuado en el gradiente problema que en el gradiente control. Este resultado nos volvió a sugerir que el aumento de marca radioactiva en las zonas "a", "b", "c" y "d" del gradiente problema, se podía deber a la asociación de proteína-Metionina^{35S} a los fragmentos de 1568 p.b.. La sugerencia se reafirmó más aún, cuando se determinó el patrón de sedimentación de los fragmentos de 1568 p.b. dentro del gradiente problema, y se comprobó su presencia a partir de la fracción No.21, ver Figura No.6 Panel A'.



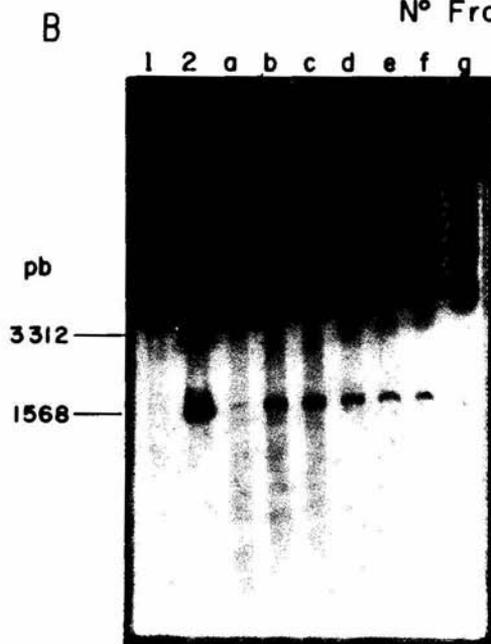
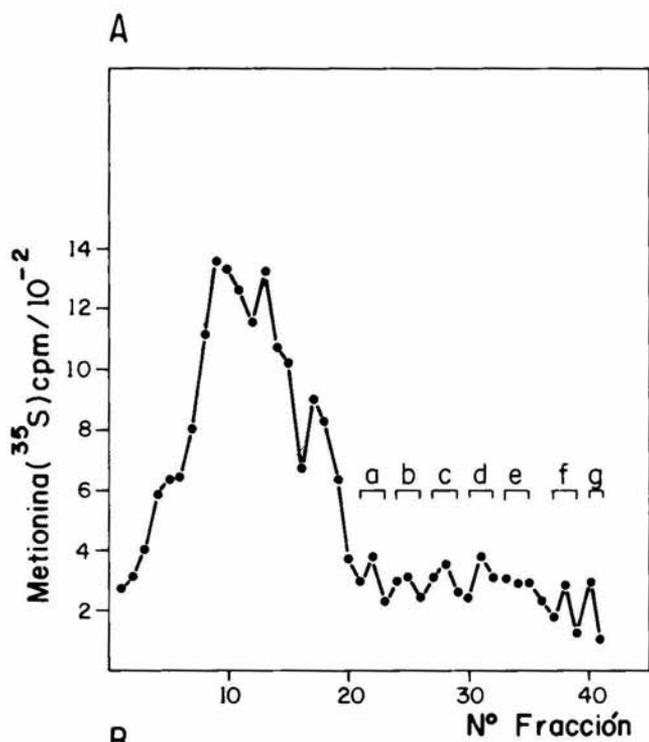
F I G U R A N o. 7

ANALISIS EN GRADIENTES LINEALES DE SACAROSA DE MEZCLAS DE TRANSCRIPCION "IN VITRO" CONTROL.

Panel A.- Perfil radioactivo obtenido en un gradiente de sacarosa en el que se colocaron, 1.5 ug de DNA (fragmentos de 1568 p.b. conteniendo el PMT-Adeno-2) mezclados y previamente incubados (en condiciones de transcripción "in vitro") con 100 ug de extracto citoplasmático control Metionina ³⁵S. Con letras se indican los grupos de fracciones que analizaron (ver Sección de Materiales y Métodos).

Panel A'.- Miniigel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio e iluminado con luz U.V., donde se muestra el DNA (fragmentos de 1568 p.b) contenido en cada uno de los grupos de fracciones indicados en el Panel A.

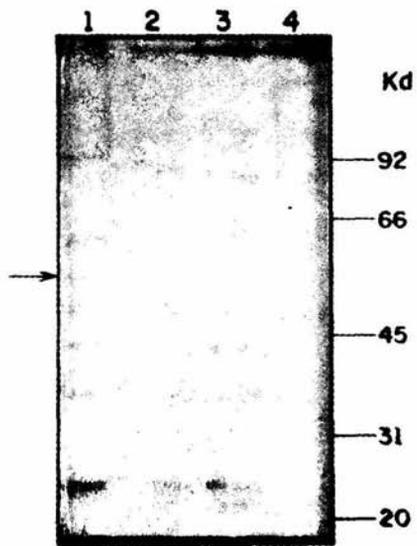
Carril 1) Plásmido pLAX sin restringir; Carril 2) Marcadores de peso molecular; fragmentos de restricción obtenidos de la digestión del plásmido pLAX enzimas Ava I y Bam HI; Carril a-q) La letra del carril corresponde al grupo de fracciones, ver Panel A, a partir del cual se obtuvo el DNA. En todos los casos el DNA que se observa en la parte superior del carril corresponde al plásmido pLAX sin digerir añadido para facilitar la precipitación de los fragmentos de 1568 p.b..



El siguiente paso para confirmar la asociación de proteína-Metionina³⁵S a los fragmentos de 1568 p.b., fué el análisis en electroforesis de los grupos de fracciones "a" y "b" del gradiente problema (ver Figura No.6 Panel A), introduciendo como controles el análisis de los grupos de fracciones homólogos a estos, obtenidos a partir de los 2 gradientes control: gradiente control No.1 -grupo de fracciones "a" y "b"- , ver Figura No.6 Panel B, gradiente control No.2 -grupo de fracciones "b" y "c"- ver Figura No. 7 Panel A.

En la Figura No.8 se puede observar la autorradiografía obtenida del gel de acrilamida al 10% en el que se introdujeron las muestras antes mencionadas. Antes de pasar al análisis de esta autorradiografía, es conveniente señalar, que a pesar de que se mejoraron las condiciones para poder obtener muestras con mayor actividad radioactiva, la cantidad de c.p.m. de Metionina³⁵S obtenida en las muestras de interés, fué de aproximadamente de 1,500 a 2,000 c.p.m., es decir apenas y se recuperó la cantidad mínima de proteína-Metionina³⁵S para ser analizada en un gel de acrilamida. El gel se sometió a fluorografía (ver sección de Métodos) y posteriormente estuvo expuesto durante 1 mes a una placa de rayos X.

En el carril 1 de la autorradiografía se pueden observar las proteínas Metionina³⁵S contenidas en la muestra problema, y en el carril 3 las contenidas en la muestra control No.1. Si se compara muy cuidadosamente los carriles 1 y 3, podrá observarse que ambos carriles aunque en apariencia idénticos, difieren en una proteína, en el carril 1 de la muestra problema, se observa



una proteína de aproximadamente 55 Kd, que no se observa en el carril 3 de la muestra control No.1.

En el carril 4 se pueden observar las proteínas-Metionina^{35S} contenidas en la muestra control No.2. Si se compara el carril 1 con el carril 4, se podrá observar que ambos carriles tienen en común varias proteínas, pero no la proteína de 55 KD, que únicamente se observa en el carril 1 que contiene la muestra problema.

De este análisis pueden concluirse varios hechos : 1) la muestra problema contiene al parecer, proteínas marcadas con Metionina^{35S} que únicamente comigran con los fragmentos de 1568 p.b. dentro del gradiente. Esta conclusión se deriva de la comparación de los carriles 1 y 3; 2) la muestra problema contiene una proteína de 55 Kd que no se encuentra presente en las muestras homólogas control; 3) la comparación de los carriles 1 y 3 nos sugiere que la proteína de 55 Kd se encuentra asociada a los fragmentos de 1568 p.b. conteniendo el PMT-Adeno-2, ya que esta proteína, se encuentra ausente en la muestra control No.1 (carril 3); 4) la comparación de los carriles 1, 3 y 4, nos sugiere que la proteína de 55 Kd detectada en la muestra problema, proviene del extracto citoplasmático infectado y no del extracto citoplasmático control.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La infección de células de mamífero con Poliovirus o cualquier otro Picornavirus ocasiona una rápida inhibición de la transcripción de la célula hospedera, afectando principalmente la síntesis de RNA dependiente de la RNA polimerasa II (Fernández-Tomás, 1987).

Se ha demostrado que a medida que transcurre la infección viral, va disminuyendo el número de moléculas de RNA polimerasa II comprometidas en el crecimiento de cadenas de RNA (Apriletti y Penhoet, 1978; Flores-Otero y cols., 1982). Así mismo, se ha reportado que la inhibición de la síntesis de RNAm celular, coincide con la modificación de la RNA polimerasa II que es, aparentemente, la forma de la enzima transcripcionalmente activa "in vivo" (Rangel y cols., 1987), y que dicha modificación, parece ser dependiente de la síntesis y procesamiento viral (Rangel y cols., 1988).

De acuerdo a la información obtenida hasta el presente, puede decirse que el virus ejerce su acción inhibitoria a nivel de la iniciación de la síntesis de cadenas de RNAm (Crawford y cols., 1981; Flores-Otero y cols., 1982).

Los estudios realizados con sistemas de transcripción "in vitro" han proporcionado una nueva aproximación, para elucidar el mecanismo por medio del cual Poliovirus inhibe la transcripción de la célula.

Crawford (1981) y Klierer y Dasgupta (1988) demostraron que

el factor de la transcripción, que copurifica con el factor transcripcional TFIID, esta inactivado en las células HeLa infectadas con Poliovirus.

Aunado a las evidencias de modificación o inactivación de factores específicos de la iniciación de la síntesis de cadenas de RNA_m en células HeLa infectadas con Poliovirus, otras líneas de evidencia experimental, han sugerido la existencia de un inhibidor viral de la transcripción celular. Esta posibilidad se fundamenta principalmente en el hecho de que se requiere de la traducción del genoma del virus para que ocurra la inhibición de la transcripción de la célula (Baltimore y Franklin,1963). La naturaleza exacta del inhibidor viral, aún no ha sido determinada. Lípidos o lipoproteínas (Ho y Washington,1971) así como proteínas virales (Balandin y Franklin,1964; Fernández-Tomás,1982; Rossart y cols.,1982;1984; Iturriaga,1984; Núñez,1985), han sido postulados como el (los) agente (s) inhibitorio (s) de la transcripción celular.

Diferentes estudios han demostrado la acumulación de proteínas virales en el interior de los núcleos de la células infectadas con Poliovirus, y que su aparición coincide con el inicio de la inhibición de la transcripción de la célula hospedera (Fernández-Tomás,1982; Bienz y cols.,1982; Rossart y cols.,1982; 1984; Núñez,1985).

Estudios realizados con un sistema de transcripción "in vitro" que inicia específicamente y que es dependiente de DNA exógeno, han proporcionado más evidencia de la existencia de un inhibidor viral. Los resultados de estos estudios sugieren, que

un factor presente en el extracto citoplasmático infectado, compite con algún factor requerido para la iniciación específica de la transcripción, presente en el extracto de Manley no infectado, por una secuencia promotora o por un sitio cercano a ésta, ocasionando la inhibición de la transcripción "in vitro" a partir del promotor tardío de Adenovirus-2 (Iturriaga, 1984).

En base a la información anterior, la estrategia experimental que se decidió seguir en este trabajo, fué analizar mediante gradientes lineales de sacarosa, la posible formación de complejos proteína-DNA, después de incubar DNA (fragmentos de 1568 p.b. conteniendo el PMT-Adeno-2) con extracto citoplasmático infectado o control marcado con Metionina³⁵S, en las mismas condiciones experimentales utilizadas para los ensayos de transcripción "in vitro". La idea fundamental de seguir esta estrategia fué la de tratar de aislar y caracterizar el posible inhibidor viral unido a los templados de DNA conteniendo el PMT-Adeno-2.

El análisis de las mezclas de DNA-proteína Metionina³⁵S en gradientes lineales de sacarosa, planteó varios inconvenientes.

Uno de los inconvenientes fué el de que, el DNA (fragmentos de 1568 p.b. conteniendo el PMT-Adeno-2) no se pudo marcar con algún isótopo radioactivo que pudiera facilitar su detección a lo largo de los gradientes. Por otra parte, dadas las pequeñas cantidades de DNA analizadas, la opción de detectarlo mediante absorbancia a 260 nm, tampoco resultó ser viable. De esta manera la única opción que nos quedó, fué el seguimiento de la marca radioactiva en la proteína-Metionina³⁵S, de esta forma, en cada

gradiente se analizaron las fracciones mediante una alícuota, se precipitó el DNA y éste se analizó, en minigeles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio tal cual se indica en la sección de Materiales y Métodos.

Otro inconveniente que se presentó fué el de que, en 3 de los 4 experimentos que se realizaron en condiciones similares, la cantidad de proteína-Metionina³⁵S (proveniente de los extractos citoplasmáticos control e infectado), capturada con los templados de DNA, resultó ser insuficiente, para ser analizada en electroforesis en gel de acrilamida (ver sección de Resultados). Este problema no llegó a superarse del todo, ya que aún cuando las mezclas de DNA-proteína Metionina³⁵S, se enriquecieron: la cantidad de DNA se aumentó de 0.5 ug a 1.5 ug, y la actividad radioactiva de los extractos citoplasmáticos control e infectado se mejoró muy considerablemente (ver Tabla No. 1), la cantidad de proteína con marca radioactiva (Metionina³⁵S) proveniente de los complejos de DNA-proteína Metionina³⁵S, fué del orden de 1500 a 2000 c.p.m.; por ésta razón, las proteínas detectadas se visualizaron de una manera muy tenue (ver Figura No.8), a pesar de todo, nos permitieron formular algunas conclusiones.

Todos los experimentos realizados sugieren la asociación de proteína-Metionina³⁵S a los templados de DNA conteniendo el PMT-Adeno-2, cuando éstos se incuban en condiciones de transcripción "in vitro", con un extracto citoplasmático infectado marcado con Metionina³⁵S. En todos los gradientes donde se analizaron mezclas de DNA-proteína marcada, aparecieron fracciones con radioactividad, no observada, en las fracciones

homólogos de los gradientes control, donde se había analizado extracto citoplasmático infectado en ausencia de DNA (ver Figura No. 6).

Cuando se analizó la proteína asociada, en los complejos de DNA-proteína, mediante electroforesis en gel de acrilamida, se observó una proteína de aproximadamente 55 Kd (ver Figura No.8 y su análisis en la sección de Resultados). Sugerimos que ésta proteína de 55 Kd es inducida durante la infección, probablemente entre las 2 1/2 y 3 1/2 hs después de iniciada la infección, tiempo en el que se sintetizan la mayor parte de las proteínas específicas del virus.

Dado que estos resultados se obtuvieron en condiciones muy parecidas a las empleadas al estudiar la inhibición de la transcripción "in vitro" (Iturriaga,1984), estos resultados nos permiten sugerir que ésta proteína de aproximadamente 55 Kd posiblemente se encuentra involucrada en este mecanismo.

Las evidencias experimentales obtenidas en este trabajo se apoyan en los resultados publicados por Lazard y cols. (1989). En ese trabajo, se demostró que un factor de la iniciación específica de la transcripción del PMT-Adeno-2 denominado USF (Chodosh y cols.,1985), de 46 Kd, se encuentra fuertemente disminuido, y que, una proteína de aproximadamente 50 Kd inducida o modificada por el virus, se une a la región específica de ese factor, la región "upstream" localizada entre -63 p.b. y -52 p.h..

La posibilidad de que ésta proteína de 50 Kd inducida o modificada por el virus, sea la misma a la detectada en este

trabajo es muy sugestiva dado que, la diferencia en el peso molecular, puede explicarse en función a la metodología empleada para su detección.

En el trabajo de Lazard y cols., se estudió la formación "in vitro" de complejos de DNA-proteína entre el factor nuclear "upstream" estimulador de la transcripción (USF) y el elemento "upstream" del PMT-Adeno-2 (UPE, localizado entre -63 p.b. y -52 p.b.). Empleando geles de retardamiento (Carthew,1985), se demostraron diferencias entre los complejos proteína-UPE formados en presencia de extractos nucleares parcialmente purificados de células HeLa infectadas con Poliovirus, comparados con los obtenidos en la presencia de extractos nucleares provenientes de células HeLa bajo infección fingida. La formación de los complejos modificados USF-UPE coincide con la inhibición inducida por el virus de la síntesis "in vivo" de RNAm celular, y con una menor eficiencia "in vitro" de la actividad transcripcional de los extractos nucleares de las células infectadas. En adición empleando una técnica de entrecruzamiento fotoquímico (Maniatis y cols.,1984), se demostró que el factor USF del hospedero de 46 Kd que se une a UPE, está fuertemente disminuido y que un polipéptido de 50 Kd inducido o modificado por el virus, aparece unido específicamente a los templados de UPE.

Si la proteína reportada en el presente trabajo fuese la misma a la detectada por Lazard y col., las implicaciones de este hallazgo dentro del contexto de la información conocida hasta el presente, en relación al mecanismo inhibitorio de la transcripción de la célula hospedera inducido por Poliovirus,

podieran ser las siguientes.

La modificación inducida por Poliovirus de la RNA polimerasa II (Rangel y cols.,1987), ocasiona la conversión de la subunidad IIO, conteniendo el dominio C-terminal altamente fosforilado (CTD) (Dahmus,1981), a la forma, aparentemente, no funcional de la enzima (Flores-Otero,1982; Rangel y cols.,1987). El requerimiento de la RNA polimerasa IIO para la síntesis "in vivo" de pre-RNA_m está bien documentada (Allison y cols.,1988; Bartholomew y cols.,1986; Bartolomei y cols.,1988; Dahmus,1981; García-Carranca y cols.,1986). Esta especie es la forma predominante en las células en crecimiento activo (García-Carranca y cols.,1986; Kim y Dahmus,1986), y está preferencialmente asociada a la cromatina celular y viral (Bartholomew y cols.,1986; García-Carranca y cols.,1986) "in vitro", la situación es completamente diferente ya que el CTD en su estado altamente fosforilado (subunidad IIO), no es esencial para la transcripción específica en los sistemas reconstituidos (Zegrubom y cols.,1988). Por tanto, los resultados presentados aquí y por Lazard y cols.,1989, sugieren que la transcripción a partir del PMT-Adeno-2 no ocurre bajo nuestras condiciones "in vitro" debido en parte por lo menos, a la asociación de la proteína de 50-55 Kd a la región "upstream" del PMT-Adeno-2 (Lazard y cols.,1989), mientras que la transcripción "in vivo" puede ser adicionalmente inhibida debido a la reducción de la actividad del factor TFIID (Kliwer y Dasgupta,1988) y la modificación de la RNA polimerasa IIO (Flores-Otero y cols.,1982; Rangel y cols.,1987).

El significado "in vivo" de la modificación de la RNA polimerasa IIO y la aparición de nuevos polipéptidos inducidos por el virus, capaces de interactuar específicamente con una región estimuladora como UPE, no es en el presente conocido. Sin embargo la posibilidad de que el CTD altamente fosforilado de la enzima este involucrado en la unión de una clase especial de factores de transcripción de la RNA polimerasa II (Allison y cols.,1988 ; Ingles y cols.,1987), sugiere que este dominio puede también proveer sitios para la interacción con las proteínas que se unen al DNA. En genes eucarióticos, los factores de transcripción que se unen a secuencias estimuladoras "upstream" o reconocen las cajas "TATA", también pudieran entrar en contacto con este dominio de la RNA polimerasa II. Si esta fuese así esperaríamos que la inhibición de la síntesis de RNAm de la célula hospedera durante la infección con Poliovirus, pudiera ser llevada a cabo por una interacción primaria del inhibidor inducido por el virus ya sea con la RNA polimerasa IIO, o un factor(es) transcripcional (es), conduciendo a una disminución de los factores asociados al CTD (Lazard y cols.,1989).

Se ha sugerido recientemente (Rangel y cols.,1988) que la modificación de la RNA polimerasa IIO puede ser debida a proteína codificada por el virus, ya que ésta es prevenida por cicloheximida y zinc. Así mismo, evidencias previas (Balandin y Franklin,1964; Fernández-Tomás,1982; Bossart y cols,1982;1984; Iturriaga,1984; Núñez,1985) sugieren la participación de proteína(s) viral(es) en la inhibición de la síntesis de RNAm celular. Los resultados de este trabajo podrían sugerir que el

polipéptido de 55 Kd es un producto codificado por el virus, que se une al PMT-Adeno-2, probablemente a la región UPE, interfiriendo con la maquinaria transcripcional de la célula.

Es necesario realizar más experimentos, para definir la naturaleza y acción de los productos inducidos por el virus, involucrados en el mecanismo de la inhibición de la transcripción de la célula hospedera.

REFERENCIAS

1.- Abraham,G. and Cooper,P.D. (1975). Relations between poliovirus polypeptides as shown by tryptic peptide analysis. J. Gen. Virol. 29: 215-221.

2.- Allison,LA.A., Wong,J.K.C., Fitzpatrick,V.D., Moyle,M. and Ingles,C.I. (1988). The C-terminal domain of largest subunit of RNA polymerase II of *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, and mammals: a conserved structure with an essential function. Mol. Cell. Biol. 8: 321-329.

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

4.- Balandin,I.G. and Franklin,R.M. (1964). The effect of Mengovirus infection on the activity of the DNA dependent RNA polymerase of L-cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 15: 27-32.

5.- Baltimore,D., Franklin, R.M.,Eggers,N.J. and Tamm,I. (1963). Poliovirus induced RNA polymerase and the effects of virus specific inhibitors on its production. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 49: 843-849.

6.- Baltimore,D., Girard,M. and Darnell,J.E. (1966). Aspects of the synthesis of Poliovirus RNA and the formation of virus particles. Virology 29: 179-189.

7.- Baltimore,D. (1968). Structure of the Poliovirus replicative intermediate RNA. J. Mol. Biol. 32: 359-368.

8.- Baltimore,D. (1969). The replication of picornaviruses. In: The Biochemistry of viruses. pp. 101-176. Editors: Levy,H.B. Marcel Dekker, New York.

9.- Bartholomew,B., Dahmus,M.E. and Meares,C.F. (1986). RNA contacts subunits IIO and IIC in HeLa in HeLa RNA polymerase II transcription complexes. J. Biol. Chem. 361: 14226-14231.

10.- Bartolomei,M.J., Halden,N.F., Cullen,C.R. and Corden,J.L. (1988). Genetic analysis of the repetitive carboxy-terminal domain of the largest subunit of mouse RNA polymerase II. Mol. Cell. Biol. 8: 330-339.

11.- Baron,M.H. and Baltimore,D. (1982). Purification and properties of a host cell protein required for Poliovirus replication "in vitro". J. Biol. Chem. 257: 12351-12358.

12.- Bienz,K., Egger,D., Rasser,Y. and Bossart,W. (1980). Kinetics and location of Poliovirus macromolecular synthesis in correlation to virus-induced cytopathology. Virology 100: 390-399.

13.- Birboim, H.C. and Doly. (1979).A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids. Res. 7: 1513.

14.- Bossart,W., Egger,D., Rasser,Y. and Bienz,K. (1982). Poliovirus-induced inhibition of host RNA synthesis studied in isolated Hep-2 cell nuclei. J. Gen. Virol. 63: 131-140.

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

16.- Burness,A.T.H., Pardoe,I.V. and Fox,S.M. (1973). Evidence for the lack of glycoprotein in the encephalomyocarditis virus particle. *J. Gen. Virol.* 18: 33-49.

17.- Butterworth,B.E. and Korant, B.D. (1974). Characterization of the large picornaviral polypeptides produced in the presence of Zn ion. *J. Virol.* 14: 282-291.

18.- Caliquiri,L.A. and Tamm, I. (1970 a). The role of cytoplasmic membranes in poliovirus biosynthesis. *Virology* 42: 100-111.

19.- Caliquiri,L.A. and Tamm,I. (1970 b). Characterization of Poliovirus-specific structures associated with cytoplasmic membranes. *Virology* 42: 112-122.

20.- Caliquiri,L.A. and Mosser,A.G. (1971). Proteins associated with the Poliovirus RNA replication complex. *Virology* 46: 375-386.

21.- Caliquiri,L.A. and Compans,R.W. (1973). The formation of Poliovirus particles in association with the RNA replication complexes. *J. Gen. Virol.* 21: 99-108.

22.- Carthew,R.W. Chodosh,L.A. and Sharp,P.A. (1985). An RNA polymerase II transcription factor binds to an upstream element in adenovirus major late promoter. *Cell* 43: 439-448.

23.- Colby,D.S., Finnerty,V. and Lucas-Lenard,J. (1974). The effect of mengovirus infection on the activity of the DNA-dependent RNA polymerase of L-cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15: 27-32.

24.- Colby,D.J., Finnerty,V. and Lucas-Lenard,J. (1974). Fate of mRNA of L-cells infected with mengovirus. J. Virol. 13: 858-869.

25.- Cole,C.N. and Baltimore,D. (1973). Defective interfering particles of poliovirus II. Nature of the defect. J. Mol. Biol. 76: 325-344.

26.- Cooper,P.D., Geissler,E., Scotti,P.D. and Tannock,G. (1971). In: The strategy of the viral genome. pp. 75. Ciba Foundation Symposium, Churchill Livingstone, Edinburgh.

27.- Cooper,P.D., Stancek,D. and Summers,D.F. (1970). Synthesis of double-stranded RNA by Poliovirus temperature sensitive mutants. Virology 40: 971-977.

28.- Crawford,M., Fire,A., Samuels,M., Sharp,P.A. and Baltimore,D. (1981). Inhibition of transcription factor activity by poliovirus. Cell 27: 555-561.

29.- Dahmus,M.E. (1981). Phosphorylation of eukaryotic DNA-dependent RNA polymerase. J. Biol. Chem. 256: 3332-3339.

30.- Dales,J., Eggers,H.J., Tamm,I. and Palade,G.E. (1965). Electron microscopic study of the formation of poliovirus. Virology 26: 379-389.

31.- Dasgupta,A. (1983). Purification of host factor required for "in vitro" transcription of poliovirus RNA. Virology 128: 245-251.

32.- Davidson,B.L., Egly,J.M., Mulvihill,E.R. and Chambon,P. (1983). Formation of stable preinitiation complexes between eukaryotic class B transcription factors and promoter sequences. Nature 301: 680-686.

- 33.- Dorner, J.A., Dorner, F.L., Larsen, R.G., et al (1982). Identification of the initiation site of poliovirus polyprotein synthesis. *J. Virol.* 42: 1017-1028.
- 34.- Drzeniek, R. and Bilello, P. (1974). Absence of glycoproteins in poliovirus particles. *J. Gen. Virol.* 25: 125-132.
- 35.- Dunnebacke, T.H., Levinthal, J.D. and Williams, R.C. (1969). Entry and release of poliovirus as observed by electron microscopy of cultured cells. *J. Virol.* 4: 505-513.
- 36.- Dynan, W.S. and Tjian, R. (1983a). Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II. *Cell* 32: 669-680.
- 37.- Egly, J.M., Miyamoto, N.G. Moncollin, V. and Chambon, P. (1984). Is actin a transcription initiation factor for RNA polymerase B? . *EMBO J.* 3: 2363-2371.
- 38.- Ehrenfeld, E. and Lund, H. (1977). Untranslated VSV mRNA after poliovirus infection. *Virology* 80: 297-308.
- 39.- Ehrenfeld, E. and Manis, J. (1979). Inhibition of 80s initiation complex formation by infection with poliovirus. *J. Gen. Virol.* 43: 441-445.
- 40.- Ehrenfeld, E. (1982). Poliovirus-induced inhibition of host cell protein synthesis. *Cell* 28: 435-436.
- 41.- Fenner, F., y White, D.D. (1972). *Medical Virology*. p.p.269-277 Academic Press, New York.
- 42.- Fenwick, M.I. and Cooper, P.D. (1962). Early interaction between poliovirus and ERK cells: some observations on the nature and significance of rejected particles. *Virology* 18: 212-223.

43.- Fernández-Muñoz,R. and Darnell,J.E. (1976). Structural difference between the 5' termini of viral and cellular mRNA in poliovirus-infected cells: possible basis for the inhibition of host protein synthesis. *J. Virol.* 126: 719-726.

44.- Fernández-Tomás,C.B. and Baltimore,D. (1973). Morphogenesis of poliovirus II. Demonstration of a new intermediate, the provirion. *J. Virol.* 12: 1122-1130.

45.- Fernández-Tomás,C.B., Guttman,N. and Baltimore,D. (1973). Morphogenesis of poliovirus III. Formation of provirion in cell-free extracts. *J. Virol.* 12: 1181-1183.

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

47.- Fernández-Tomás,C.B. (1987). Virus - induced suppression of host mRNA. In: *Mechanism of viral toxicity in animal cells.* pp. 21-58. Editors: L. Carrasco. CRC Press: 21-58.

48.- Finch,J.T. and Klug,A. (1959). Structure of poliomyelitis virus. *Nature (London)* 183: 1709-1714.

49.- Fire,A. Samuels,M. and Sharp,P.A. (1984). Interactions between RNA polymerase II, factors and template leading to accurate transcription. *J. Biol. Chem.* 259: 2509-2516.

50.- Flanagan,J.B. and Baltimore,D. (1977). Poliovirus specific primer-dependent RNA polymerase able copy poly (A). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 3677-3680.

51.- Flanagan,J.B. and Baltimore,D. (1979). Poliovirus polyuridylic acid polymerase and RNA replicase have the same viral polypeptide. *J. Virol.* 29: 352-360.

52.- Flores Otero,G., Fernández Tomás,C.B. and Gariglio Vidal,P. (1982). DNA-bound RNA polymerases during poliovirus infections: reduction in the number of form II enzyme molecules. *Virology* 116: 619-628.

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

54.- García-Carranca,A., Miguel,F., Dahms,M.E. and Gariglio,P. (1986). Structure of monkey kidney cell RNA polymerase associated with SV40 late transcription complexes. *Arch. Biochem. Biophys.* 251: 232-238.

55.- Girard,M. (1969). "In vitro" synthesis of poliovirus ribonucleic acids: role of the replicative intermediate. *J. Virol.* 3: 376-384.

56.- Hand,R. and Oblin,C. (1977). DNA synthesis in Mengovirus-infected cells: mechanism of inhibition. *J. Gen. Virol.* 37: 349-358.

57.- Hand,R. and Tamm,I. (1972). Rate of DNA chain growth in mammalian cells infected with cytocidal RNA viruses. *Virology* 47: 331-337.

58.- Helentjaris,T. and Ehrenfeld,E. (1977). Inhibition of host cell protein synthesis by UV-Inactivated Poliovirus. *J. Virol.* 21: 259-267.

59.- Helentjaris,T. and Ehrenfeld,E. (1978). Control of protein synthesis in extracts from poliovirus-infected cells. I. mRNA discrimination by crude initiation factors. *J. Virol.* 26: 510-521.

60.- Ho, P.P.K. and Washington, A.C. (1971). Evidence for a cellular ribonucleic acid synthesis inhibitor from poliovirus-infected HeLa cells. *Biochemistry* 10: 3646-3651.

61.- Holland, J.J. (1962). Irreversible eclipse of poliovirus by HeLa cells. *Virology* 16: 163-176.

62.- Holland, J.J. and Peterson, J.A. (1964). Nucleic acid and protein synthesis during poliovirus infection of human cells. *J. Mol. Biol.* 8: 556-573.

63.- Huang, A.S. and Baltimore, D. (1970). Initiation of polyribosomes formation in poliovirus-infected HeLa cells. *J. Mol. Biol.* 47: 275-291.

64.- Ingles, C.J., Moyle, M., Allison, L.A., Wong, J.K.C., Archambault, J. and Friesen, J.D. (1987). Molecular genetics of eukaryotic RNA polymerases. *UCLA Symp. Mol. Cell. Biol.* 52: 383-393.

65.- Iturriaga, G. (1984). Inhibición de la iniciación específica de la transcripción eucariótica por extractos citoplasmáticos de células infectadas con poliovirus. Tesis de maestría. CINVESTAV-IPN. México, D.F..

66.- Jacobson, M.F., Asso, J. and Baltimore, D. (1970). Further evidence on the formation of poliovirus protein. *J. Mol. Biol.* 49: 657-669.

67.- Jacobson, M.F. and Baltimore, D. (1968). Morphogenesis of poliovirus: association of the viral RNA with coat protein. *J. Mol. Biol.* 33: 369-378.

68.- Jacobson, M.F. and Baltimore, D. (1968). Polypeptide cleavages in the formation of poliovirus proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 61: 77-84.

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

70.- Kim, W.Y. and Dahmus, M.E. (1986). Immunochemical analysis of mammalian RNA polymerase II subspecies. J. Biol. Chem. 261: 14219-14225.

71.- Kitamura, N. et al (1980). The Genome-linked protein of Picornaviruses. VII genetic mapping of Poliovirus VPg by protein and RNA sequence studies. Cell 21: 295-302.

72.- Kitamura, N., Semler, B.L., Rothberg, P.G., Larsen, G.R., Adler, Ch.J., et al (1981). Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. Nature 291: 547-553.

73.- Kliewer, S. and Dasgupta, A. (1988). An RNA polymerase II transcription factor inactivated in poliovirus-infected cells copurifies with transcription factor TFIID. Mol. Cell. Biol. 8: 3175-3182.

74.- Korant, B., Chow, N., Lively, M. and Powers, J. (1979). Virus-specific protease in poliovirus infected HeLa cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76: 2992-2995.

75.- Lazard, D., Fernández-Tomás, C., Gariglio, P. and Weinmann, R. (1989). Modification of an adenovirus major late promoter-binding factor during poliovirus infection. J. Virol. 63: 3858-3864.

76.- Leibowitz,R. and Penmann,J. (1971). Regulation of protein synthesis in HeLa cells J. Virol. 8: 661-668.

77.- Levintow,L. (1974). The reproduction of picornaviruses. In: Comprehensive virology, Vol. 2. pp.109. Editors: Fraenkel-Conrat,H. and Wagner R.R. Plenum Press, New York.

78.- Lowry,O.H., Rosebroug,N.J., Farr,A.L. and Rondall,R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

79.- Lundquist,R.E., Ehrenfeld,E. and Maizel,J.V.Jr. (1974). Isolation of a viral polypeptide associated with poliovirus RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71: 4773-4777.

80.- Maniatis,T., Fritisch,E.F. and Sambrook,J. (1984). Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab. U.S.A..

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

82.- Matsui,T., Segall,J., Weil,P.A. and Roeder,R.G. (1980). Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. J. Biol. Chem. 255: 11992-11996.

83.- McClaren,L.C., Scalette,J.V. and James,C.G. (1968). Isolation of properties of enterovirus receptors. In: Biological properties of the mammalian surface membrane. pp. 123-135. Editors: Manson,I. Wistar Institute Press, Philadelphia,Pa.

84.- Miller,H.I., Penhoet,E.F. (1972). Differential inhibition of nuclear RNA polymerases in L cells infected with mengovirus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 140: 435-438.

85.- Miller,D.A., Miller,O.J., Dev,H.G., Hashmi,J., et al (1974). Human chromosome 19 carries a poliovirus receptor gene. Cell 1: 167-173.

86.- Moncollin,V., Miyamoto,M.G.,Zheng,X.M. and Egly,J.M. (1986). Purification of a factor specific for the upstream element of the adenovirus-2 major late promoter. EMBO. J. 5: 2577-2584.

87.- Nomoto,A., Lee,Y.F. and Wimmer,E. (1976). The 5' end of poliovirus mRNA is not capped with $m_7(5')ppp(5')Np$. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 375-380.

88.- Nuss,D.L., Oppermann,H. and Koch,G. (1975). Selective blockage of initiation of host protein synthesis in RNA-virus-infected-cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 1258-1262.

89.- Núñez,M.E. (1985). Análisis de proteínas en núcleos aislados de células HeLa bajo infección con el virus de la poliomiélitis. Tesis de licenciatura. U.N.A.M. ENEP Iztacala. México,D.F..

90.- Oberg,B. and Philipson,L. (1971). Replicative structures of poliovirus RNA in vivo. J. Mol. Biol. 58: 725-737.

91.- Parker,C.J. and Topol,J. (1984a). A Drosophila RNA polymerase II transcription factor contains a promoter-region specific DNA-binding activity. Cell 36: 357-369.

92.- Penman,S., Scherrer,K., Becker,Y. and Darnell,J.E. (1963). Polysomes in normal and poliovirus-infected HeLa cells and their relationship to messenger-RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 49: 654-661.

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

94.- Phillips,B.A. (1971). In vitro assembly of poliovirus II. Evidence for the self-assembly of 14s particles into empty capsids. Virology 44: 307-316.

95.- Phillips,B.A. and Fennell,R. (1973). Polypeptide composition of poliovirions, naturally occurring empty capsids and 14s particles. J. Virol. 12: 291-299.

96.- Plagemann,P. (1971). Nucleotide Pools of Novikoff rat hepatoma cells growing in suspension culture II. Independent nucleotide pools for nucleic acid synthesis. J. Cell. Physiol. 77: 241-258.

97.- Price,R. and Penman,S. (1972). Transcription of the adenovirus genome by alpha amanitin-sensitive RNA polymerase in HeLa cells. J. Virol. 9: 621-626.

98.- Rangel,L.M., Fernández Tomás,C., Dahaus,M.E. and Gariglio Vidal,P. (1987). Modification of RNA polymerase II α subspecies after poliovirus infection. J. Virol. 61: 1002-1006.

99.- Rangel,L.M., Fernández Tomás,C., Dahaus,M.E. and Gariglio Vidal,P. (1988). Poliovirus-induced modification of host cell RNA polymerase II α is prevented by cycloheximide and zinc. J. Biol. Chem. 263: 19267-19269.

100.- Reinberg, D., Horikoshi, M. and Roeder, R.G. (1987). Factors involved in specific transcription of initiation factors TFIIA and TFIID and identification of a new factor operating at sequences downstream of the initiation site. *J. Biol. Chem.* 262: 3310-3321.

101.- Reinberg, D. and Roeder, R.G. (1987). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification and functional analysis of initiation factors TFIIB and TFIIE. *J. Biol. Chem.* 262: 3310-3321.

102.- Rekosh, D.M.K. (1977). The Molecular Biology of Picornavirus. In: *The Molecular Biology of Animal Viruses, Vol.1.* pp. 63-110 Editors: Nayak, P.D. Marcel Dekker Inc., New York.

103.- Rose, J.K. and Lodish, H.F. (1976). Translation "in vitro" of vesicular stomatitis virus mRNA lacking 5'-terminal 7-methylguanosine. *Nature* 262: 32.

104.- Rueckert, R.R. (1971). Picornaviral architecture. In: *Comparative Virology.* pp. 225-306. Editors: Maramorosch, K. and Kurstak, E. Academic Press, New York.

105.- Sabin, A.B. (1962). Oral poliovirus vaccine: Recent results and recommendations for optimum use. *R. Soc. Health. J.* 2: 51.

106.- Saborio, J.L., Pong, S.S. and Koch, G. (1974). Selective and reversible inhibition of initiation of protein synthesis in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 85: 195-211.

107.- Safer, B., Cohen, R.B., Garfinkel, S. and Thompson, J.A. (1988). DNA affinity labeling of Adenovirus type 2 upstream promoter sequence-binding factors identifies two distinct

proteins. Mol. Cell. Biol. 8: 105-113.

108.- Salk, J.E. (1955). A concept of the mechanism of immunity for preventing poliomyelitis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 61: 1023.

109.- Sawadogo, M. and Roeder, R.G. (1985). Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region. Cell 43: 165-175.

110.- Sonenberg, N., Morgan, M., Merrick, W. and Shatkin, A.J. (1978). A polypeptide in eucaryotic initiation factors that cross links specifically to 5' terminal cap in mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4843-4847.

111.- Steiner-Pryor, A. and Cooper, P.D. (1973). Temperature sensitive poliovirus mutants defective in repression of host protein synthesis are also defective in structural protein. J. Gen. Virol. 21: 215-225.

112.- Summers, D.F., Maizel, J.V.Jr. and Darnell, J.E.Jr. (1967). The decrease in size and synthetic activity of poliovirus polysomes late in the infectious cycle. Virology 31: 427-435.

113.- Summers, D.F. and Maizel, J.V.Jr. (1971). Determination of the gene sequence of poliovirus with pactamycin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68: 2852-2856.

114.- Summers, D.F., Shaw, E.N., Stewart, M.L. and Maizel, J.V.Jr. (1972). Inhibition of cleavage of large poliovirus-specific precursor proteins in infected HeLa cells by inhibitors of proteolytic enzyme. J. Virol. 10: 880-884.

115.- Taber, R., Rekosh, D. and Baltimore, D. (1971). Effect of pactamycin on synthesis of poliovirus proteins: a method for genetic mapping. J. Virol. 8: 395-401.

116.- Tannock,G.A., Gibbs,A.I. and Cooper,P. (1970). A reexamination of the molecular weight of poliovirus RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38: 298-304.

117.- Thach,J., Dobbertin,D., Lawrence,C., Golini,F. and Thach,R.E. (1974). The mechanism of viral replication. Structure of the replication complexes of encephalomyocarditis virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 71: 2549.

118.- Trachsel,H., Sonenberg,N., Shatkin,A.J. et al (1980). Purification of a factor that restores translation of VSV mRNA in extracts from poliovirus-infected HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 770-774.

119.- Wallace,R.D. and Kates,J. (1972). State of Ad2 DNA in the nucleus and its mode of transcription. *J. Virol.* 9: 627-635.

120.- Watanabe,Y., Watanabe,K. and Hinuma,Y. (1962). Synthesis of poliovirus-specific proteins in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 61: 976-977.

121.- Weil,P.A. Luse,D.S., Segall,J. and Roeder,R.G. (1979). Selective and accurate initiation of transcription at Ad2 major late promoter in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA. *Cell* 18: 469-484.

122.- Willems,M. and Penman,S. (1966) The mechanism of host cell protein synthesis inhibition by poliovirus. *Virology* 30: 355-367.

123.- Yogo,Y. and Wimmer,E. (1972). Polyadenylic acid at the 3' terminus of poliovirus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 1877-1882.

124.- Zegrubgm,W.A., Lee,J.M., Weeks,J.R., Jokerst,R.S. and Greenleaf, A.L. (1988). The C-terminal repeat domain of RNA polymerase II largest subunit is essential "in vivo" but is not required for accurate transcription initiation "in vitro". Proc. Acad. Sci. USA 85: 3698-3702.

125.- Zheng,X., Moncollin,V., Egly,J.M. and Chambon,P. (1987). A general transcription factor forms a stable complex with RNA polymerase B (II). Cell 50: 361-368.