

03062

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

UACPyP/CCH.

Instituto de Biotecnología

SECUENCIACION DEL GENE 1 DE ROTAVIRUS PORCINO YM.

Tesis

**que para obtener el grado de Maestría en Investigación Biomédica Básica
presenta**

Q. F. B. Leticia Almanza Sánchez

Cuernavaca, Mor.

Enero de 1994.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1
2eje.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

UNIDAD ADADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

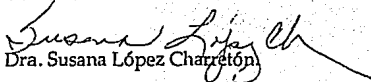
1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN.

Los rotavirus, son considerados como uno de los principales agentes causales de gastroenteritis aguda no bacteriana en infantes y niños menores de 2 años de edad. Estos virus se encuentran formados por un genoma de 11 segmentos de RNA de doble cadena (RNA dc), rodeado por tres capas concéntricas de proteínas; pertenecen a la familia *Reoviridae* y al igual que los otros miembros de esta familia, la transcripción y replicación de su genoma se lleva a cabo por medio de una transcriptasa-replicasa endógena. Se ha propuesto que la proteína VP1, codificada por el segmento 1 del genoma se encuentra asociada a los segmentos genómicos formando parte de las nucleocápsides virales, y puede ser la enzima responsable de la replicación y/o transcripción. Las evidencias que sugieren que VP1 es la polimerasa viral son: mutantes termosensibles (Ts) que mapean en el segmento 1, presentan defectos en la síntesis de dcRNA; y el análisis de secuencias de la proteína VP1 del rotavirus RF (cepa bovina), presenta cuatro motivos estructurales que se encuentran conservados entre RNA polimerasas dependientes de RNA (RPDRs). En este trabajo, secuenciamos el segmento 1 del genoma del rotavirus porcino YM, con el objetivo de comparar su secuencia de aminoácidos con las proteínas VP1 de rotavirus previamente reportadas, así como con las posibles RPDRs. Nuestros resultados son los siguientes: la secuencia completa del gene 1 del rotavirus YM es de 3302 nucleótidos, contiene un marco abierto de lectura de 1088 codones, que codifican para una proteína con un peso molecular calculado de 134 kd, y una carga neta de + 15.5 a pH 7.0. La comparación de esta proteína con las VP1 previamente reportadas, presenta una homología entre 89-97 % siendo más alta entre las cepas porcinas (YM y Gottfried), que con las cepas bovinas (RF y UK), y en menor medida con la cepa de simio (SA11). Cuando comparamos las secuencias de aminoácidos de las proteínas VP1 de rotavirus del grupo A (YM, Gottfried, UK, RF, SA11) y del grupo C (Cowden), con la posible RPDR de reovirus, observamos ocho motivos estructurales que se conservan entre proteínas de rotavirus del grupo A, y del grupo C y, que son característicos en las proteínas que funcionan como RPDRs. El porcentaje de homología a nivel de aminoácidos de las proteínas VP1, de los grupos A y C es de 48.2 %, sin embargo los ocho motivos estructurales son estrictamente conservados, sugiriendo el importante papel de estas regiones en la actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA.

Vo.Bo. del director de tesis.


Dra. Susana López Charrón

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Susana López Charretón.

**A mi familia,
con todo mi amor.**

**A Susi y Carlos,
por abrirme la puerta que me permitió entrar
al fascinante mundo de la Biología Molecular.**

**A todos mis compañeros de laboratorio,
por hacer agradable la estancia en el mismo.**

**A la Universidad Autónoma de Zacatecas,
por todo lo que me ha brindado.**

INDICE

I.	RESUMEN	
II.	INTRODUCCION	1
III.	ANTECEDENTES	8
IV.	OBJETIVO	14
V.	MATERIAL Y METODOS	15
VI.	RESULTADOS	18
VII.	DISCUSION	38
VIII.	CONCLUSIONES	41
IX.	BIBLIOGRAFIA	42
X.	ANEXO	47

RESUMEN.

Los rotavirus, son considerados como uno de los principales agentes causales de gastroenteritis aguda no bacteriana en infantes y niños menores de 2 años de edad. Estos virus se encuentran formados por un genoma de 11 segmentos de RNA de doble cadena (RNA dc), rodeado por tres capas concentricas de proteínas; pertenecen a la familia *Reoviridae* y al igual que los otros miembros de esta familia, la transcripción y replicación de su genoma se lleva a cabo por medio de una transcriptasa-replicasa endógena. Se ha propuesto que la proteína VP1, codificada por el segmento 1 del genoma se encuentra asociada a los segmentos genómicos formando parte de las nucleocápsides virales, y puede ser la enzima responsable de la replicación y/o transcripción. Las evidencias que sugieren que VP1 es la polimerasa viral son: mutantes termosensibles (Ts) que mapean en el segmento 1, presentan defectos en la síntesis de dcRNA; y el análisis de secuencias de la proteína VP1 del rotavirus RF (cepa bovino), presenta cuatro motivos estructurales que se encuentran conservados entre RNA polimerasas dependientes de RNA (RPDRs). En este trabajo, secuenciamos el segmento 1 del genoma del rotavirus porcino YM, con el objetivo de comparar su secuencia de aminoácidos con las proteínas VP1 de rotavirus previamente reportadas, así como con las posibles RPDRs. Nuestros resultados son los siguientes: la secuencia completa del gene 1 del rotavirus YM es de 3302 nucleótidos, contiene un marco abierto de lectura de 1088 codones, que codifican para una proteína con un peso molecular calculado de 134 kd, y una carga neta de + 15.5 a pH 7.0. La comparación de esta proteína con las VP1 previamente reportadas, presenta una homología entre 89-97 % siendo mas alta entre las cepas porcinas (YM y Gottfried), que con las cepas bovinas (RF y UK), y en menor medida con la cepa de simio (SA11). Cuando comparamos las secuencias de aminoácidos de las proteínas VP1 de rotavirus del grupo A (YM, Gottfried, UK, RF, SA11) y del grupo C (Cowden), con la posible RPDR de reovirus, observamos ocho motivos estructurales que se conservan entre proteínas de rotavirus del grupo A, y del grupo C, que son característicos en las proteínas que funcionan como RPDRs. El porcentaje de homología a nivel de aminoácidos de las proteínas VP1, de los grupos A y C es de 48.2 %, sin embargo los ocho motivos estructurales son estrictamente conservados, sugiriendo el importante papel de estas regiones en la actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA.

INTRODUCCION

Con el descubrimiento de los rotavirus en 1972 (5) estos han sido considerados como los principales agentes etiológicos de enfermedades diarréicas no bacterianas en infantes y niños menores de 2 años de edad (7, 12, 25). Resultados de estudios seroepidemiológicos, demuestran que estos virus tienen una amplia distribución tanto en la población humana como en especies animales de importancia económica para el hombre, como; bovinos, cerdos, corderos, caballos, conejos, y aves (2, 13, 43).

Los rotavirus, son considerados como un género dentro de la familia *Reoviridae* (16, 25). Estos han sido divididos en seis grupos denominados A, B, C, D, E, y F, en base a diferentes pruebas serológicas como inmunofluorescencia, ELISA, e inmunomicroscopía electrónica. Los epítopes que determinan estos grupos, están localizados en la proteína más abundante del virión (VP6) (37). Además, en los rotavirus del grupo A se han detectado 2 determinantes antigénicos más en esta proteína, que son responsables de la especificidad de subgrupo (21). Por otro lado, en base a ensayos de neutralización (4) los rotavirus de este mismo grupo se han clasificado en 14 serotipos.

Los rotavirus aislados de humanos y, de animales muestran propiedades morfológicas y bioquímicas comunes. Por medio de microscopía electrónica (ME), se han observado tres tipos de partículas: las partículas virales maduras (infecciosas) son de 76.5 nm de diámetro y tienen la apariencia de una rueda de carreta, morfología que dió lugar al nombre rotavirus (del latín rota, que significa rueda), se observan también, partículas incompletas de 70.5 nm de diámetro, éstas carecen de la cápside externa, y se

observan como partículas rugosas debido a los capsómeros que conforman la cápside interna, y partículas más pequeñas de aproximadamente 50 nm de diámetro a las que se les ha denominado nucleocápsides (17) (figura 1).

El análisis de la estructura tridimensional utilizando criomicroscopía electrónica y procesamiento de imágenes, ha demostrado que las partículas virales completas tienen 132 canales acuosos de aproximadamente 70Å de amplitud en la superficie y 70Å de profundidad, que atraviesan las dos cápsides. Este tipo de canales se ha observado en virus que tienen actividad de RNA-transcriptasa endógena, y se ha sugerido que éstos canales son usados para importar los metabolitos requeridos para la transcripción y exportar las cadenas nacientes de RNA mensajero (RNAm) (15)

ESTRUCTURA Y ORGANIZACION DEL GENOMA.

El genóma viral consiste de 11 segmentos de RNA de doble cadena (dcRNA), que suman un total de aproximadamente 18,000 pares de bases (pb). Los genes son numerados del 1 al 11 en base al peso molecular de cada segmento, siendo el gene 1 el de mayor peso molecular, de aproximadamente 3 300 pb, y el gene 11 el de menor peso molecular con un tamaño aproximado de 650 pb (15). Seis de los segmentos del genoma codifican para proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, y VP7), presentes en el virión y cinco para proteínas no estructurales (NS53, NS35, NS34, NS28, y NS26), presentes en las células infectadas (15). Estudios hidrodinámicos de flexibilidad de los segmentos de dcRNA aislados en solución, indican que los 11 segmentos no pueden ser empaquetados dentro de la cápside, a menos que existan interacciones RNA-proteínas (24). Las proteínas estructurales presentes en la nucleocápside (VP1, VP3 y VP2) son las candidatas obvias, pero además se propone que las proteínas no estructurales, NS34,

NS53, NS35 y NS26 pueden jugar también un papel importante en el empaquetamiento del RNA en etapas tempranas de la replicación del genoma (36) (figura 1).

Recientemente el análisis de la estructura de los rotavirus por estudios de criomicroscopía electrónica y procesamiento de imágenes, ha demostrado que los virus están formados por tres capas concéntricas de proteínas que rodean al genoma. La capa más interna está formada por la proteína VP2 (102 kD), la cual engloba el genoma viral, y pequeñas proporciones de las proteínas VP1, y VP3, este conjunto constituye la nucleocápside del virión. La nucleocápside, a su vez, está circundada por la capa intermedia constituida por la proteína VP6 (45 kD), formando las partículas de una sola cápside (40). Las partículas de doble cápside maduras contienen además, la capa más externa de proteínas del virión constituida por la glicoproteína VP7 (37 kD), y la proteína VP4 (87 kD) que son los blancos de anticuerpos neutralizantes.

Todos los genes virales comparten algunas características, tales como la presencia de secuencias no codificadoras en los extremos 5' y 3', un solo marco de lectura abierto que codifica para una proteína, un $m^7GpppG^{(m)}GPy$ ("cap") en su extremo 5' en la cadena de polaridad positiva (RNA mensajero) y no se encuentran señales de poliadenilación en el extremo 3' terminal de los genes. Dentro de las regiones no codificadoras, en los extremos 5' y 3' de todos los genes se observan secuencias de 10 y de 7 nucleótidos respectivamente, que están conservados entre todos los genes, sugiriendo que estas regiones contienen señales importantes para transcripción, replicación y/o empaquetamiento (15) (Figura 2). El número total de nucleótidos de cada gene, así como la longitud de las secuencias no codificadoras 5' y 3' varían para cada uno, no obstante, estas longitudes se conservan entre diferentes cepas para un mismo gene.

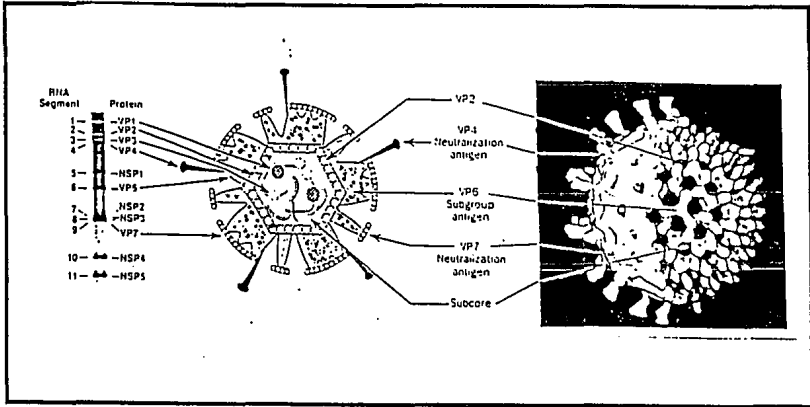


Figura 1. Representación esquemática de rotavirus, genoma y proteínas estructurales. En el lado izquierdo de la figura, se representan los 11 segmentos de dcRNA que forman el genoma de rotavirus, así como las proteínas codificadas por éstos. Al centro se esquematizan las tres capas concéntricas que conforman la partícula viral; la capa exterior la forman las proteínas VP4 y VP7, la intermedia la proteína VP6, y la interna VP2 (M. K. Estes. Fourth International Symposium on Double-Stranded RNA Viruses. 1992.).

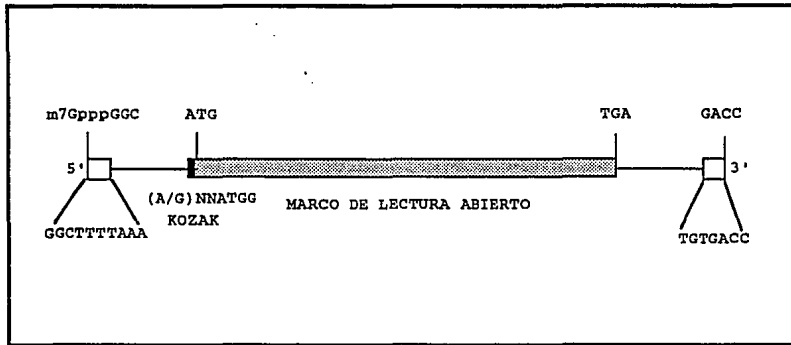


Figura 2. Características principales observadas en las secuencias de nucleótidos de los genes de rotavirus. En esta figura se muestra un esquema de la cadena de polaridad positiva de un gene viral. Los genes contienen un extremo 5' modificado (cap), carecen de una señal de poliadenilación y contienen secuencias conservadas en los extremos 5' y 3' (cuya secuencia se muestra). El área sombreada indica el marco de lectura abierto.

Se sabe poco de las propiedades biológicas de las proteínas no estructurales, sin embargo, su presencia en partículas subvirales con actividad de replicasa (NS53, NS34, NS35, NS26) (35, 36) y la observación de que mutantes termo-sensibles (Ts) que mapean en estos segmentos presentan un fenotipo dcRNA negativo (20), sugiere que estas proteínas pueden funcionar como parte de un complejo enzimático implicado en replicación (NS53, NS34, NS35, NS26) y/o morfogénesis del virus (NS28) (15).

PROTEÍNAS ESTRUCTURALES DE CAPSIDE INTERNA Y DE NUCLEOCAPSIDE.

La proteína VP2, es codificada por el segmento 2 del genoma (14, 27, 34), es la proteína estructural más abundante presente en la nucleocápside, y es la tercera más abundante en partículas de doble cápside (30). Tiene la capacidad de unirse a ácidos nucleicos (dcRNA, csRNA, y dcDNA) (27). El análisis de la secuencia de VP2 muestra que esta proteína contiene leucinas cada 7 residuos, a partir del aminoácido 536 al 665 conformando por dimerización un arreglo periódico de "zipper de leucina", responsable de la interacción con los RNAs virales (15, 27).

VP3, es codificada por el segmento 3 del genoma (28, 30), es la proteína que se encuentra en menor proporción en los viriones (0.5 %) (15). Mutantes sensibles a temperatura, que mapean en este gene, tienen un fenotipo RNA negativo (20), sugiriendo que esta proteína juega un papel importante en la replicación del RNA. Recientemente se ha demostrado que la proteína VP3, une GTP, por lo que se propone que ésta proteína podría tener la función de guaniltransferasa, la enzima responsable de añadir 7 metil guanosina en el extremo 5' del RNAm ("capping") (29, 38).

VP6, codificada por el segmento 6, es la proteína más abundante de los rotavirus (51 %)(15). La remoción *in vitro* de VP6 de las partículas sin cápside externa, resulta en la pérdida de actividad de polimerasa (9, 11, 42), aunque VP6 *per se* no presenta ninguna actividad detectable *in vitro*. Estos resultados indican que VP6 es requerida para la actividad de polimerasa, pero no necesariamente es la responsable de tal actividad, más bien puede ser un componente estructural importante necesario para mantener la conformación apropiada de la nucleocápside viral ó del complejo transcripcional compuesto de una ó más de las proteínas de nucleocápside (15).

VP1 es codificada por el segmento 1 del genoma, representa el 2% de la masa del virión (15), tiene un peso molecular aproximado de 124 kD. es una proteína básica y relativamente hidrofóbica (6, 10, 18). El número tan pequeño de moléculas de VP1 que se encuentra presente en los viriones, sugiere que su función estructural no es muy importante, pero si puede ser parte de un complejo multienzimático encargado de la replicación y transcripción. Las evidencias que sugieren que VP1 pudiera ser la polimerasa viral son: mutantes Ts que mapean en el segmento 1, tienen un fenotipo RNA-negativo (20, 41). Por otro lado, cuatro motivos estructurales que se encuentran conservados en RNAs polimerasas dependientes de RNA, incluyendo al virus bluetongue e "infectious bursae disease virus" (ambos son virus de dcRNA) (39) , se encuentran también presentes en las VP1 de las cepas de rotavirus bovino RF y porcino Gottfried (10, 18).

ANTECEDENTES.

El ciclo de replicación de rotavirus, comprende diferentes etapas: adsorción, penetración y desencapsidación del virión, transcripción del genoma, ensamble del virión, replicación del genoma, y liberación de la partícula madura. (figura 3).

El primer paso durante la infección productiva es la adsorción del virus a la célula huésped a través del reconocimiento entre una proteína presente en la partícula viral y una molécula receptora localizada sobre la membrana celular.

El paso siguiente a la adsorción viral es la penetración y desencapsidación del virus, proponiéndose dos rutas de entrada que dependen de si el virus es tratado con tripsina o no, los viriones no tratados con tripsina, entran a la célula por endocitosis y no producen progenie viral; mientras que la entrada del virus tratado con tripsina conduce a una infección productiva, en este caso, se ha propuesto un mecanismo de "penetración directa" (figura 3).

TRANSCRIPCIÓN DEL GENOMA.

Una vez dentro de la célula, comienza el proceso de transcripción (dcRNA → mRNA) en el que se producen los mRNAs (cadena +) virales, que sirven como molde tanto para la traducción de proteínas, así como para la producción de la cadena (-) del RNA genómico. Las partículas virales que carecen de la capa externa son las responsables de la síntesis de los mRNA virales (19). La actividad de transcriptasa puede ser inducida *in vitro* por la remoción de las proteínas de la cápside externa

debido al tratamiento de las partículas completas con un agente quelante ó por calor (40). Los transcritos que se obtienen a partir de estas partículas *in vitro* son idénticos a los observados en células infectadas, contienen nucleótidos modificados en su extremo 5' ($m^7GpppG^{(m)}GPy$). Las modificaciones en el extremo 5' del mRNA requieren de varias reacciones enzimáticas, que se encuentran incluidas en las nucleocápsides y como se ha mencionado anteriormente, se ha sugerido a la proteína VP3 como responsable de esta función (29, 38)

Después de la transcripción, y traducción de proteínas virales, comienzan simultáneamente dos procesos: el ensamblado de la partícula viral, y la replicación del genoma (35, 36) en una región densa que se observa en el citoplasma de células infectadas, a la que se le ha llamado viroplasma. Una vez que el proceso de replicación del genoma ha concluido, las partículas aún en formación migran hacia el retículo endoplásmico, a través del cual geman a su interior, completando de esa manera su proceso de maduración, al adquirir las proteínas de cápside externa. Posteriormente, la lisis celular libera partículas virales maduras (15).

REPLICACION DEL GENOMA.

La replicación del genoma (mRNA \rightarrow dcRNA), requiere de dos condiciones; una es la existencia de mRNA (cadena +), que es utilizado como molde para sintetizar la cadena negativa del RNA y la segunda es la existencia de proteínas virales asociadas a esta cadena (+). Las partículas con actividad de replicasa son heterogéneas, consisten de una población de partículas que varían en contenido de proteínas, tamaño, y densidad (19, 22, 35, 36). En células infectadas, se han detectado, tres tipos de partículas

subvirales intermediarias de la replicación (RI) llamadas: 1) prenucleocápsides de 45 nm, que contienen las proteínas estructurales VP1, VP3, y las no estructurales NS35, NS34, y NS26 (35, 36); 2) nucleocápsides de 60 nm, que contienen las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3, y las no estructurales NS35, NS34, y NS26; y 3) las partículas de una sola cápside de 75 nm, contienen las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3, VP6, y las no estructurales NS35, NS34, y NS26. Lo anterior sugiere que las partículas de una sola cápside, son formadas por una adición secuencial de VP2 y VP6 respectivamente a las prenucleocápsides, realizándose simultáneamente la morfogénesis de partículas de una sola cápside y la síntesis de dcRNA (36)

En resumen, las proteínas involucradas en el proceso de replicación (m RNA → dcRNA), son las proteínas de cápside interna VP1, VP2, VP3, VP6 y las no estructurales NS35, y NS34, y NS26 (22, 36), mientras que las proteínas involucradas en transcripción (dcRNA → mRNA), son las proteínas de cápside interna; VP1, VP2, VP3, y VP6 (11). Las partículas con actividad de replicasa al ser separadas por electroforesis, migran diferente de las partículas con actividad de transcriptasa, lo que demuestra que ambas partículas son estructuralmente diferentes (36). La transcripción y replicación del genoma del virus ocurre en el citoplasma de la célula, esta síntesis es catalizada por una RNA polimerasa endógena dependiente de RNA (9).

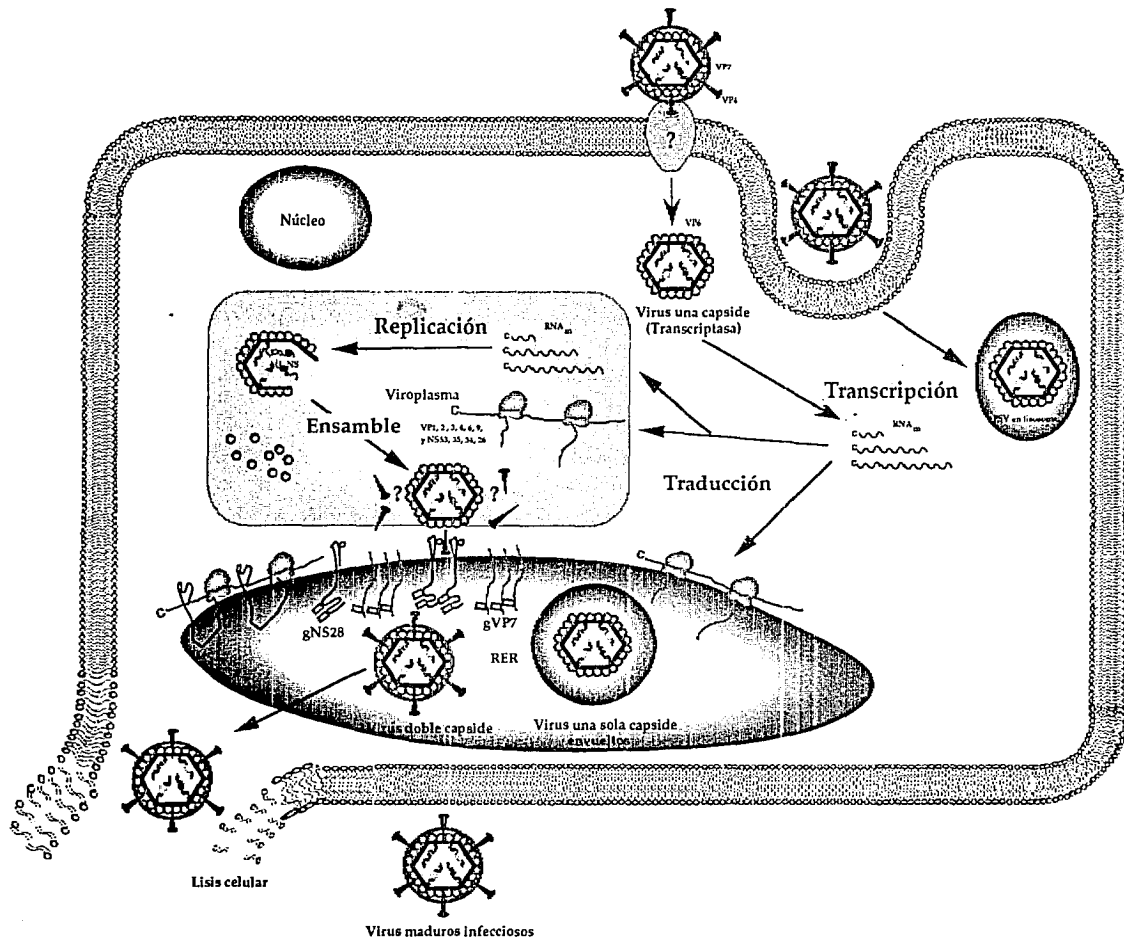


Figura 3. Principales características del ciclo de replicación de rotavirus.

CARACTERISTICAS DE LAS RNA POLIMERASAS DEPENDIENTES DE RNA.

Las RNAs polimerasas dependientes de RNA (RPDRs), son codificadas únicamente por virus con genomas de RNA; éstas, se han clasificado en tres clases: a) RDRPs de virus con genomas de RNA de polaridad positiva, b) RDRPs de virus con genomas de RNA doble cadena, y c) RDRPs de virus con genomas de RNA de polaridad negativa (8)

Las primeras RDPRs que se identificaron fueron de virus de cadena (+), en base a su similitud con la polimerasa de poliovirus, encontrándose además que una de las regiones conservadas (YGDD) esta presente también en las RNA polimerasas dependientes de DNA (23). Posteriormente esta región conservada se observó en DNA polimerasas dependientes de DNA, y en otras RNA polimerasas dependientes de RNA (3).

La disponibilidad de muchas otras secuencias de genomas virales en bancos de datos, ha hecho posible hacer varios alineamientos para cada uno de los grupos de RPDPs. Inicialmente se describieron cuatro motivos estructurales conservados en polimerasas pertenecientes a todos los grupos, incluyendo en el de RPDRs de virus de dcRNA, como BTV (blue tongue virus), e IBDV (infection bursae disease virus) (37)

Recientemente, en base a este tipo de comparaciones, se reportó la existencia de ocho motivos estructurales conservados entre posibles RDPRs de virus con genomas de cadena (+) y virus con genomas de doble cadena entre los que se incluye a rotavirus (cepa bovina RF), reovirus, IBDV, BTV, Phi6, y ScV (8) Los primeros tres motivos; el ácido D_xS_{xxxxx}D, el S_xG_{xxx}T_{xxx}N y el GDD, ya se habían reportado previamente (37). El cuarto motivo (básico) K, se encuentra aproximadamente 120 bases adelante de

la región **GDD**, el quinto y sexto motivos tienen las secuencias consenso **FCG**, y **LKR** respectivamente. El séptimo motivo es una secuencia básica precedida por un residuo aromático, y el octavo motivo es un residuo aromático precedido por una secuencia básica. En todos los casos, se ha observado que los motivos se encuentran localizados cerca del extremo carboxilo terminal de la proteína (3, 8, 39).

Predicciones de estructuras secundarias sugieren que cada uno de los motivos propuestos, pueden asociarse para formar un dominio bien ordenado, implicado tanto en el reconocimiento del molde como en la actividad de polimerasa (39), se ha sugerido que el dominio catalítico de las **RDRPs** es el motivo **GDD** (3).

OBJETIVO.

En 1983, en nuestro laboratorio se aisló una cepa de rotavirus porcino, a partir del contenido intestinal de un lechón con diarrea. La caracterización molecular de este virus, designado YM, es importante debido a que ha sido adoptado como el modelo experimental de estudio .

El objetivo de este trabajo, fue el determinar la secuencia de nucleótidos del gene 1 que codifica para la proteína VP1 de rotavirus YM. Una vez obtenida la secuencia de nucleótidos, deducir la secuencia de aminoácidos de la proteína, para hacer una búsqueda de regiones conservadas con proteínas que tienen actividad de RNAs polimerasas dependientes de RNA. En base a estos resultados, establecer, si la proteína VP1 de rotavirus YM pudiera estar implicada en el complejo enzimatico transcriptasa-replicasa.

MATERIAL Y METODOS.

Al inicio de este trabajo contabamos con un banco de cDNA del genoma del rotavirus porcino YM (clonado en el sitio de *Eco* RI del vector pMT21), y con 3 clonas (1.1, 1.2, y 1.3) caracterizadas previamente por hibridación en punto con el gene 1 de YM (31).

Para la segunda etapa del proyecto se utilizó un banco de cDNA del genoma de rotavirus YM (clonado en *Eco* RI del vector lambda-ZAP II) obtenido comercialmente (CLONTECH Laboratories, Inc.).

En general la metodología empleada a lo largo de este trabajo, se basó en las técnicas reportadas en los manuales *Molecular cloning* (32) y en el *Current Protocols in Molecular Biology* (1).

La metodología consultada en *Molecular cloning* fué: marcaje radioactivo de sondas por Nick Translation (pp. 10.6 -10.10); hibridación *in situ* de colonias bacterianas (pp. 1.92); transformación de *E. coli*, (cepas MC1061 y JM101) (pp. 1.82 - 1.84). La purificación de DNA plasmídico se realizó por el método de lisis alcalina, con posteriores etapas de purificación con polietilenglicol (PEG 8000), de acuerdo al método de R. Treisman (Maniatis, pp. 1.38-1.41). La digestión del plásmido, y las reacciones de ligasa, se hicieron de acuerdo al protocolo reportado en las páginas 5.31 y 1.68 respectivamente, tomando en cuenta las recomendaciones especificadas en cada producto. La identificación de clonas, se realizó por medio de análisis de restricción de DNA y separación de los fragmentos en geles de agarosa 0.8 % teñidos con bromuro de etidio y visualizados con lámpara de luz uv. La subclonación de insertos en el fago M13 se hizo de acuerdo al protocolo de la página 4.35.

La metodología para: hibridación *in situ* de placas de fago lambda, purificación de DNA del fago M13, y purificación de DNA de fago lambda se consultó en el **Current Protocols in Molecular Biology**, páginas: 6.1.1 - 6.1.3, 1.15.2 - 1.15.3 y 1.12.2, 1.13.7 respectivamente.

La determinación de la secuencia, se hizo por el método de Sanger. utilizando como molde DNA de cadena sencilla utilizando el fago M13 y la enzima Sequenase (version 2.0) de acuerdo con el protocolo recomendado por la casa comercial que distribuye el producto (USB). Brevemente, el método está basado en la capacidad de la DNA polimerasa del fago T7 modificada, para sintetizar una hebra de DNA a partir de un oligonucleótido sintético el cual hibrida con el vector de clonación en uno de los extremos que flanquea la secuencia que contiene los sitios de clonación. Tomando como sustrato el extremo 3' del oligo va polimerizando hasta que un dideoxinucleótido se incorpora, terminando la polimerización. Cada experimento de secuencia se lleva a cabo en cuatro reacciones separadas, cada una de las cuales contiene los cuatro deoxiribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), suplementado con una cantidad limitada de solamente un dideoxiribonucleótido trifosfato (ddNTP). Debido a que el ddNTP carece del grupo OH en la posición 3', el cual es requerido para la elongación de la cadena, el oligonucleótido que está creciendo es terminado selectivamente en A, C, G, ó T, dependiendo del dideoxinucleotido análogo en esa reacción. Las concentraciones relativas de cada uno de los dNTPs y ddNTPs pueden ser ajustados para dar un conjunto de cadenas terminadas sobre varios cientos a pocos miles de bases en longitud. Los fragmentos resultantes, cada uno con un origen común, pero terminando en diferente nucleótido, son separados de acuerdo a su tamaño por medio de electroforesis en un gel desnaturalizante de alta resolución.

En la tercera etapa, para concluir el trabajo experimental, se utilizó el mismo método (Sanger) para la secuenciación, con ligeras variaciones ya que se utilizó DNA de doble cadena como templado y para desnaturalizarlo se empleó el siguiente método: a aproximadamente 3 µg de DNA junto con 15 pm. del oligo apropiado se le añade NaOH a una concentración final de 0.2M, se incuba 5 min a 85° C, se neutraliza con acetato de sodio 0.05M concentración final, se enfría rápidamente en hielo, se precipita con etanol, se resuspende y se utiliza inmediatamente para las reacciones de secuencia, con el mismo protocolo empleado para cadena sencilla.

La comparación de secuencias de nucleótidos, aminoácidos y búsqueda de homología se llevó a cabo utilizando el paquete de análisis de secuencias (Genetic Computer Group, Inc., Madison, WI.), utilizando los siguientes programas; BestFit, para comparar y obtener similitud entre dos secuencias, y PileUp, para hacer alineamientos de un grupo de secuencias, y los programas FastA y TFASTA para analizar las secuencias correspondientes a las dos primeras etapas del trabajo.

RESULTADOS.

Al inicio de este proyecto en 1988, no se había reportado todavía ninguna secuencia de genes 1 de rotavirus. Para determinar la secuencia del gene 1 del rotavirus porcino YM, partimos de un banco de cDNA (editado al azar) del genoma de este virus que había sido clonado en el plásmido pMT21 (31).

La selección de clonas recombinantes en el banco de pMT21, se hizo por hibridación en colonia, utilizando como sondas las clonas 1.1, 1.2 y 1.3, marcadas previamente por nick translation, estas clonas fueron seleccionadas por su hibridación positiva con el segmento 1, aislado del genoma de YM. Se analizaron 950 colonias del banco, de las que se seleccionaron 23 por su hibridación positiva con las clonas 1.1, 1.2 y 1.3.

De éstas 23 colonias positivas, se seleccionaron las cuatro clonas que contenían los insertos más grandes (clona 11 de 800 pb, clona 16 de 300 pb, clona 17 de 500 pb, y la clona 22 de 270 pb). Los insertos de estas clonas se subclonaron en M13 (mp18), y se transformaron en JM101. Se aisló el DNA de una sola cadena de cada uno de los fagos recombinantes, y se secuenciaron utilizando como primer el oligo universal (5' GTAAAACGACGGCCAGT3') de M13 (33).

Encontramos que las clonas 16 y 17, contenían el mismo inserto (por solapamiento de secuencias). De estas dos clonas obtuvimos la secuencia de 285 nucleótidos que tenían homología en la región 488-773, con la secuencia del gene 1 del rotavirus bovino RF (cuya secuencia apareció durante el desarrollo del presente trabajo) (10).

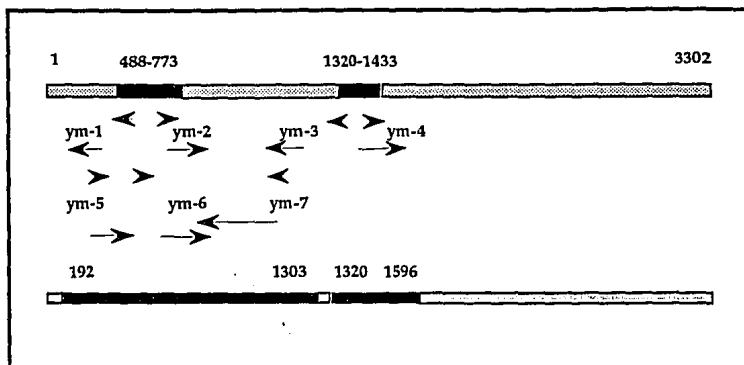
La secuencia obtenida de la **clona 22** (398 nucleótidos) se localiza entre los nucleótidos 1320-1433. La secuencia obtenida de la **clona 11** no mostró ninguna homología con la secuencia del gene 1 reportado, por lo que se descarto. Con este mismo banco, no fué posible aislar mas clonas positivas para el gene 1, que nos dieran nueva información.

Dados los resultados anteriores, decidimos trabajar con un banco comercial de cDNA (editada al azar) del genoma de rotavirus YM. Este banco consiste de clonas de cDNA insertadas en el sitio *Eco* RI, del fago lambda-ZAPII.

Se hizo una búsqueda, por hibridación en placa, de fagos recombinantes que contuvieran insertos del gene 1 del rotavirus YM, utilizando como sondas los insertos de las **subclonas 16, 17, y 22** (marcadas por nick translation). La hibridación, fué en condiciones de alta astringencia y solo se seleccionaron las placas que dieron las señales más intensas. Obtuvimos 10 placas recombinantes y se determinó el tamaño de los insertos por digestion del DNA de estos fagos con *Eco* RI, los resultados fueron los siguientes: en 4 clonas no se observó ningún inserto, 2 clonas con insertos de alrededor de 1000 pb y en cuatro clonas se observaron 2 insertos de aproximadamente 2000 y 1300, lo cual nos sugirió que existía al menos un sitio interno de *Eco* RI en el gene 1. Seleccionamos una clona con cada tipo de inserto: una clona con el inserto de 1000 pb y otra clona conteniendo el inserto de 3,300 pb. Los insertos de estas clonas se escindieron por digestión con *Eco* RI y se subclonaron en el fago M13 (mp18).

De esta subclonación obtuvimos fagos con insertos de 1000 y 1300 pb; en el caso del inserto de 2000 pb no tuvo éxito la subclonación. Los DNAs de cadena sencilla de las subclonas obtenidas se secuenciaron con oligonucleótidos sintéticos diseñados a partir de las secuencias del gene 1 de YM obtenidas previamente. Los oligonucleótidos utilizados así como las secuencias que se obtuvieron a partir de estos se muestran en la

figura 4. En resumen con estos experimentos obtuvimos la secuencia de 1387 nucleótidos del gene 1, que comprendía de los nucleótidos 193 al 1303, y del 1320 al 1596.



Oligo	Nucleótidos	Secuencia obtenida
Ym-1	504-488	420-192
Ym-2	747-772	859-988
Ym-3	1337-1321	1303-1087
Ym-4	1336-1355	1431-1529
Ym-5	316-330	372-652
Ym-6	747-772	742-929
Ym-7	1123-1109	1089-863

Figura 4. Representación esquemática de las secuencias obtenidas a partir del banco genómico en lambda-ZapII. En el cuadro superior se representa en primer lugar el gene 1 completo (sombreado) de 3302 pb., así como las secuencias obtenidas previamente (áreas oscuras) con el banco genómico en pMT21. Las flechas indican la orientación de los oligos que fueron diseñados en base a las secuencias conocidas. Las líneas representan la orientación y el tamaño de las secuencias obtenidas a partir de los oligos que se encuentran señalados arriba de éstas. El cuadro inferior resume los oligos utilizados, localización y secuencia obtenida a partir de ellos.

Para completar la secuencia de este gene y contando con la informacion de las secuencias de los genes 1 de las cepas de rotavirus RF, UK Gottfried, y SA11 (10, 18, 34, 44) que fueron publicadas durante el desarrollo de esta tesis, se decidió clonar dirigidamente el gene 1 del rotavirus porcino YM en el plásmido pGEM-3Z (Promega).

Para este fin, utilizamos las secuencias ya publicadas y diseñamos oligonucleotidos sinteticos complementarios a los extremos 5' y 3' del gene 1 (figura 5). Por otra parte, se obtuvo RNA mensajero total del rotavirus YM (producido *in vitro* a partir de nucleocápsides virales (11). El mRNA total obtenido, se utilizó como molde para la síntesis de cDNA del gene 1, utilizando transcriptasa reversa de AMV (Avian Myeloblastosis Virus) y como primer el oligonucleótido YM1-3' complementario al extremo 3' del gene 1. En este oligo los últimos 15 nucleótidos son complementarios al extremo 3' de la cadena positiva y ademas se le añadieron sitios de restricción para las enzimas *Sac* II y *Sma* I, para dirigir la posterior clonación.

El cDNA obtenido, se amplificó por PCR utilizando el oligo YM1-3' y el oligo YM1-5' que contiene 16 nucleotidos complementarios al extremo 5' del gene 1 en la cadena negativa, diseñado también en base a a las secuencias ya reportadas, este oligo ademas contiene sitios para las enzimas *Kpn* I, y *Sma* I.

El producto de PCR obtenido tuvo el peso molecular esperado de aproximadamente 3300 pb. Este, fue digerido con *Sma* I y se donó en el sitio *Sma* I del plásmido pGEM3Z. De las colonias transformantes resistentes a ampicilina, se tomaron 18 colonias de las que se obtuvo DNA del plásmido, y de éstas por digestión con *Sma* I se seleccionaron 4 que contenían insertos del peso molecular esperado. La orientación de estas clonas con respecto al promotor T7 se determinó por su patrón de restricción con *Kpn* I (ver figura 6).

YM1-3' 5' CAGACCCGGGCCGCGGTCACATCTAAGCG 3'

Sma I *Sac* II

YM1-5' 5' CAGACCCGGGTACCTATTAAGCTATACA 3'

Sma I *Kpn* I

Figura 5. Secuencia nucleotídica de los oligos YM1-3' y YM1-5 empleados en la clonación del gene 1 de YM. Las secuencias subrayadas indican las regiones complementarias a los extremos 5' y 3' del gene, también de los sitios de restricción incluidos en estos oligos.

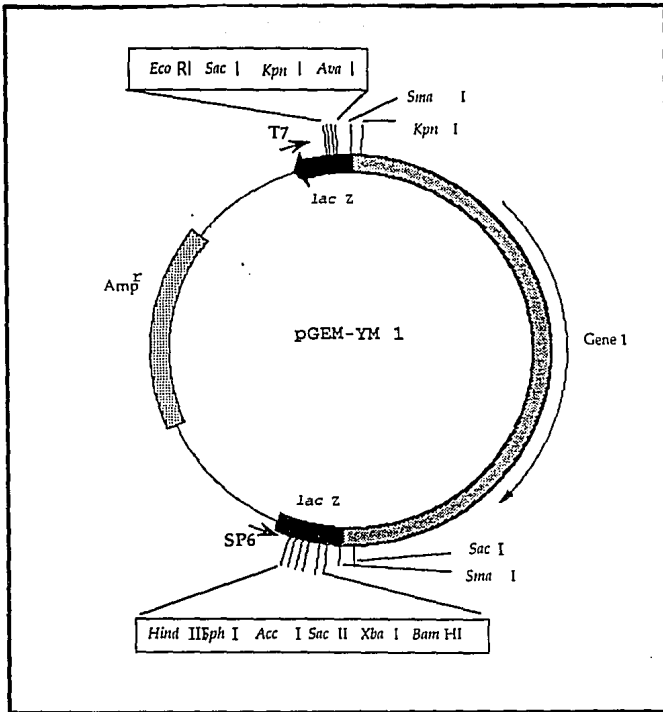


Figura 6. Representación esquemática de la clona que contiene el gene 1 de YM insertado en pGEM3Z. En esta figura se muestra el gene 1 en la orientación correcta con respecto al promotor T7 (clona 1-7). La clona 1-4 (no mostrada) es de orientación inversa con respecto al promotor T7.

Además, las 4 clonas seleccionadas se utilizaron para transcripción *in vitro* utilizando el promotor de T7 en el plásmido. Los mRNA obtenidos se tradujeron en un sistema de traducción libre de células. Estos ensayos además de confirmar la orientación del gene en el plásmido, nos permitieron corroborar la funcionalidad del gene clonado, ya que obtuvimos dos clonas que codifican para una proteína del peso molecular esperado para VP1.

Para este trabajo seleccionamos una clona de cada orientación (con respecto al sitio de clonación múltiple y al promotor de T7); la clona 1-7 (orientación correcta) y la clona 1-4 (orientación inversa).

Se hicieron mapas de restricción de estas clonas utilizando enzimas con sitios presentes en el sitio de clonación múltiples y basados en los genes 1 ya reportados. Con la información obtenida de estas digestiones, obtuvimos subclonas conteniendo fragmentos del gene 1 de menor peso molecular, para facilitar la secuenciación.

En la figura 7 se muestra un esquema de las construcciones obtenidas a partir de esta estrategia, se utilizaron las enzimas de restricción *Eco* RI, y *Hind* III, sobre la clona 1-7. La subclona IH4 contiene un inserto del gene 1 de YM que va desde el nucleótido 1 hasta el 2018, la subclona IE5, contiene un inserto del gene 1 de YM que corresponde a los nucleótidos 2206 hasta 3302; posteriormente cada una de estas dos subclonas, se digirió por separado; IH4 con *Eco* RI, e IE5 con *Bam* HI, con estas digestiones obtuvimos otras dos subclonas: IH4Eco (1492-2017) e IE5Bam (2206-2947).

La misma estrategia se siguió con la clona 1-4 (la cual es de orientación opuesta a la clona 1-7). Esta clona se digirió por separado con las enzimas *Bam* HI y *Eco* RI y se obtuvieron dos subclonas adicionales; la subclona BR1-II que comprende de los nucleótidos 2947 al 3302 y la subclona ER1-III del 1 al 1492 (figura 8)

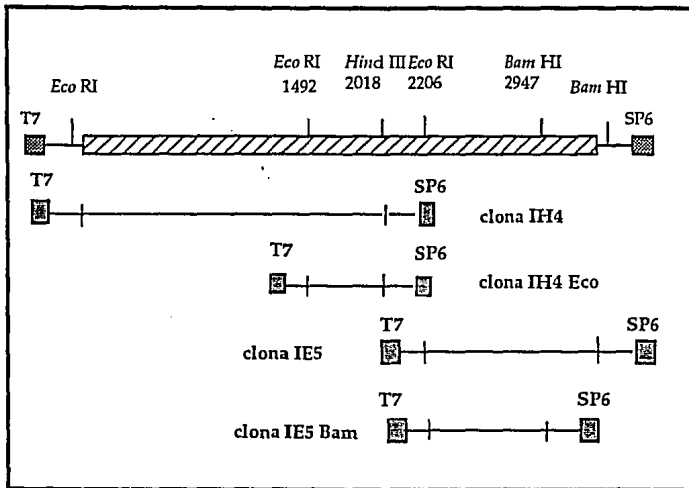


Figura 7. Representación esquemática de las subclonas obtenidas a partir de la clona 1-7. Se muestra en cada caso la posición de los promotores T7 y SP6 presentes en el plásmido pGEM3Z. Se representa además la localización de los sitios de corte de las enzimas utilizadas.

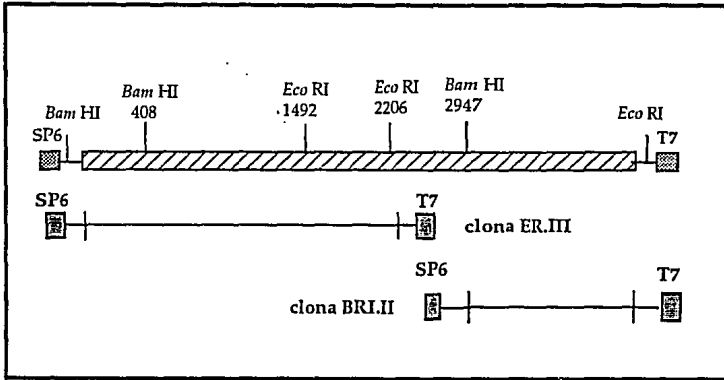


Figura 8. Representación esquemática de las subclonas obtenidas a partir de la clona 1-4 (orientación inversa a la clona 1-7). Se muestra la posición de los promotores T7 y SP6, así como de los sitios de corte de las enzimas utilizadas.

Utilizamos estas seis construcciones para la determinación de la secuencia del gene 1 de YM, utilizando como primers en la reacción de secuencia, oligonucleótidos complementarios a las secuencias promotoras T7 y SP6 respectivamente y que se encuentran flanqueando el sitio de clonación múltiple en donde se encuentra clonado el gene 1. En la figura 9, se muestran las regiones que logramos secuenciar con esta estrategia. Para completar la secuencia de las regiones que no pudimos secuenciar con estas subclonas, se diseñaron oligonucleótidos complementarios a las secuencias ya conocidas.

En la parte A de la figura 9, se representa el tamaño del gene 1 (3302 pb), en la parte B se muestran las secuencias obtenidas previamente (banco en pMT21, y banco en lambda-ZapII). En la parte C, se muestra las secuencias obtenidas a partir de las subclonas IH4 e IH4Eco, utilizando los oligos T7 y SP6 como primers, se obtienen las secuencias correspondientes desde el nucleótido 1 en el extremo 5' hasta 372, 1528-1685, y 1691-2018. En la parte D, con las subclonas IE5 e IE5Bam, se obtienen las secuencias comprendidas entre 2216-2439, 2711-2942, 3052-3302. En la parte E, con las construcciones BR1.II y ER1.III, se obtiene la secuencia desde 1250 hasta 1364, y desde 2954 hasta 3070. La parte F, de la figura representa los cinco oligonucleotidos que fueron diseñados, tomando en cuenta las secuencias anteriores, y las regiones donde hibridan. Con estos oligonucleotidos, se determino la secuencia de las siguientes regiones: 1900 (1970-2226), 2400 (2429-2670), 2700 (2513-2730), 3000 (2795-3019), 1798 (1638-1736), lo cual nos permitió completar la secuencia del gene 1 de YM.

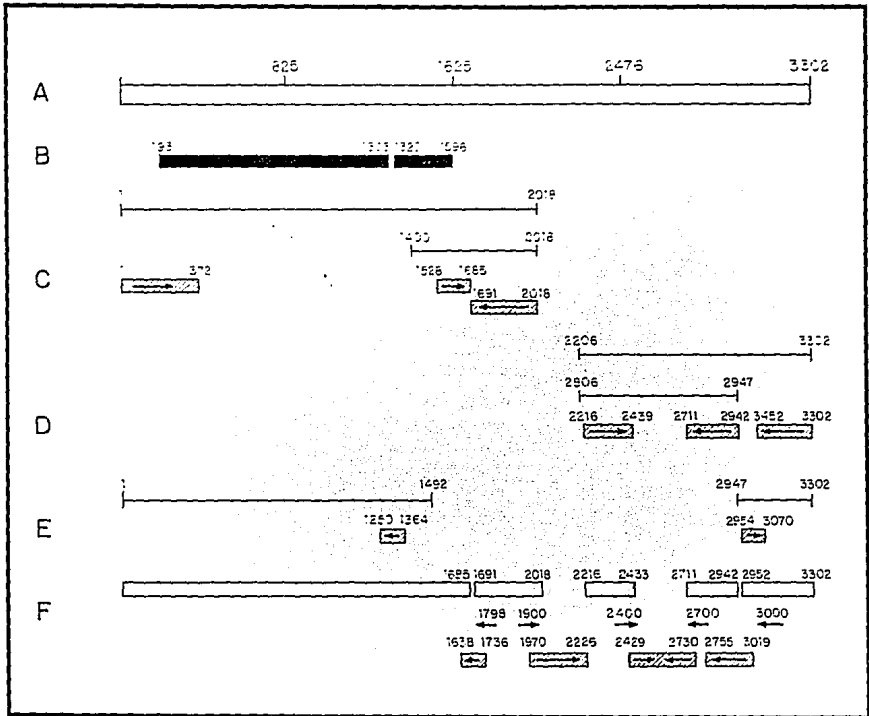


Figura 9. Representación esquemática de la estrategia general utilizada para obtener la secuencia del gene 1 de rotavirus porcino YM. Las flechas dentro de las cajas sombreadas indican el sentido de la lectura, las flechas en la parte F indican el sentido de los oligos.

La secuencia completa del gene 1 del rotavirus YM es de 3302 nucleótidos, contiene un marco abierto de lectura de 1088 codones que comienza en el nucleótido 19, y termina en el 3281. El primer codón ATG de inicio en la base 19, se encuentra flanqueado por la secuencia consenso reportada para los codones fuertes de inicio según las reglas de Kozak (A/G)NNATGG (26). En el extremo 5' se encuentra una secuencia no codificadora de 18 nucleótidos, dentro de la cual las primeras 10 bases (5'GGCUAUUAAA) son conservadas con otros genes de rotavirus YM. De igual manera en la región terminal 3' se encuentra una secuencia no codificadora de 20 nucleótidos, cuyos últimos 7 bases (AUGUGACC 3') son conservados con los demás genes de rotavirus YM (figura 10). Sin embargo el diseño de los oligonucleótidos utilizados para hacer el cDNA, y amplificación por PCR pudieron enmascarar alguna variación en los extremos de este gene.

La secuencia completa de nucleótidos del gene 1 de YM, se comparó con las secuencias de nucleótidos del gene 1 reportadas previamente, provenientes de distintos orígenes animales: cepa Gottfried (porcino), cepa UK (bovino), cepa RF (bovino), y cepa SA11 (simio), para determinar el porcentaje de homología entre estos genes. De esta comparación se puede observar que a nivel de nucleótidos la secuencia del gene 1 de YM está más relacionada con la cepa Gottfried (78 %) que con las cepas RF y UK (87 %), y con SA11 (87 %) (Tabla 1).

La proteína codificada por el gene 1 del rotavirus YM es de 1088 aminoácidos, con un peso molecular calculado de 134 kD y con una carga neta de + 15.5 a pH 7.0. La secuencia de aminoácidos de la VP1 de YM se comparó con las secuencias de aminoácidos de las proteínas VP1 de diferentes cepas de rotavirus previamente reportadas, en donde nuevamente se observa la más alta homología de YM con Gottfried (97 %), que con RF y UK (90 %), y en menor medida con SA11 (89 %). (Figura 11) (tabla 2).

GGC TAT TAA AGC TAT ACA ATG GGG AAG TAC AAT CTA ATC TTG TCA GAA TAT TTG TCA TTT GTC.TAT.AAT.TCA.CAA
met gly lys tyr asn leu ile leu ser glu tyr leu ser phe val tyr asn ser gln
ATA CCA ATT TAT TAT TCT TCC AAT TCT TCT GAG TTA GAG AAA AGA TGT ATT GAT TTT CAT GCT AAG TGT GTT GAT AAT
ile pro ile tyr tyr ser ser asn ser gly leu glu lys arg cys att gat ttt cat gct aag tgt gtt gat aat
TCA AAG AAA GGT TTA TCA CTG AGC TCT CTG TTT GAA GAA TAT AAA GAT GTA ATA GAT AAC GCA ACT TTA CTA TCT
ser lys lys gly leu ser leu ser ser leu phe glu glu tyr lys asp val ile asp asn ala thr leu leu ser
ATA TTA TCA TAT TCC TAT GAT AAA TAT AAT GCC GTA GAA CGG AAA TTA ATT AAC TAT GCT AAG GGT AAA CCA TTA
ile leu ser tyr ser tyr asp lys tyr asn ala val glu arg lys leu ile asn tyr gct aag ggt aaa cca tta
GAA GCG GAT TTA ACA GCG AAT GAA CTT GAT TAT GAA AAT AAC AAA ATA ACT TCT GAA TTA TTT AAG TCA GCT GAA
glu ala asp leu thr ala asn glu leu ser tyr glu asn asn lys ile thr ser glu leu phe lys ser ala glu
GAA TAC ACT GAT TCA TTG ATG GAT CCT GCT ATA TTA ACT TCA ATA TCA TCT AAC TTA AAT GCT GTC ATG TTT TGG
glu tyr thr asp ser leu met asp pro ala ile leu thr ser ile ser ser asn leu asn ala val met phe trp
TTG GAG CGT CAT TCA AAT GAT GTT GGT GAT CCG AAC AAG GTT TAT AGA CGT AGA CTA GAT TTA TTC ATT ATA GTA
leu glu arg his ser val gly asp ala asn lys val tyr arg arg val phe ser his val asp asp
GCA TCC ACA ATT AAT AAG TAT GGA GTT CCA AGA CAT AAT GAA AAG TAT AGA TAT GAA TAC GAA GTA ATG AAA GAT
ala ser thr ile asn lys tyr gly val pro arg his asn glu lys tyr arg tyr glu tyr glu val mrc lys asp
AAA CCG TAT TAT CTA GTA ACC TGG GCC AAT TCA GCT ATA GAA ATG TTG ATG TCA GTA TTC TCA CAT GAG GAT TAT
lys pro tyr tyr leu val thr trp ala asn ser ala ile glu met lys met ser val phe ser his glu gat tyr
TTA ATA GCG AAA GAA TTG ATA ATC TTA TCA TAC TCT AAT AGG TCT ACG TTA GCT AAA TTG GTG TCA TCT CCT ATG
leu ile ala lys glu leu ile ile glu leu phe tyr ser asn arg ser thr leu ala lys leu val ser ser met
TCA ATA TTA GTT GCA TTA ATT GAT ATA AAT GGT ACA TTT ATT ACA AAT GAG GAG TTG GAA CTT GAG TTC TCA GAT
ser ile leu val ala leu ile asp ile asn gly thr phe ile thr asn glu glu leu glu leu glu phe ser asp
AAA TAC GTA AAG GCA ATC GTA CCT GAT CAA ACT TTT AAT GAA TTA CAG GAA ATG ATT GAT AAT ATG AAA AAG GCT
lys tyr phe lys ala ile val pro asp gln thr phe asn glu leu phe asn met lys lys ala lys ala
GGT TTA GTA GAC ATA CCG AGA ATG ATT CAA GAG TGG TTA GTT GAT TGT TCA CTA GAA AAA TTC ACA CTA ATG TCG
gly leu val asp ile pro arg met ile gln glu trp leu val asp cys ser leu glu lys phe thr leu met ser
AAG AYT TAT TCT TGG TCG TTT CAT GTT GGA TTT AGG AAA CAG AAG ATG ATA GAT GCT GCA TTG GAT CAA TTA AAG
lys ile tyr ser trp ser phe his val gly phe ile leu pro gly arg lys gln lys met ile leu pro tyr asn ser ala gln
ACT GAA TAT ACT GAG GAT GTA GAT AAT GAA ATG TAT AAT GAA TAC ACG ATG CTA ATT AGA GAT GAG ATA CTC AAG
thr glu tyr thr glu asp val asp asn glu met tyr asn glu tyr thr met leu ile phe arg asp glu ile val lys
ATG CTT GAA GTG CCA GTC AAG CAT GAT GAT CAT CTG TTA CGT GAT TCT GAG TTA GCT GGA TTA CTA TCT ATG TCA
met leu glu val pro val lys his asp asp his leu leu arg asp ser glu leu ala gly leu leu ser met ser
TCA GCC TCA AAT GGT GAA TCA AGA CAA CTA AAA TTT GGT CGT AAA ACG ATA TTC TCG ACT AAG AAA AAT ATG CAT
ser ala ser asn gly glu ser arg gln leu lys phe gly arg lys thr ile phe ser thr lys lys asn met his
GTT ATG GAT GAT ATT GCT CAC GGA AGA TAT ACT CCA GGT GTT ATA CCT CCA GTA AAT GTT GAT AGA CCG ATT CCA
val met asp asp ile ala his gly arg tyr thr pro gly val ile pro pro val asn val asp arg pro ile pro
CTA GGA CGC AGA GAT GTT CCT GGG CGA AGA ACA AGA ATT ATA TTC ATA TTA CCG TAT GAA TAT AAT TCC GCG CAA
leu glu arg arg asp val pro gly arg thr arg ile ile phe ile leu pro tyr glu tyr tyr asn ser ala gln
CAC GCT GTG GTA GAA AAA ATG TTA TCA TAT GCA AAG CAT ACT AGA GAA TAT GCA GAA TTC TAT TCA CAA TCA AAT
his ala val val glu lys met leu ser tyr ala lys his thr arg glu tyr ala glu phe tyr ser gln ser asn
CAA TTG TTG TCA TAT GGT GAC GTT ACG AGA TTT TTA TCT AGT AAT TCT ATG TCA TTA TAT ACA GAT GTT TCG CAA
gln leu leu ser tyr gly asp val thr arg phe leu ser ser asn ser met val leu tyr thr asp val ser gln
TGG GAT TCA TCA CAA CAC AAT ACA CAA CCA TTC CGA AAA GGA ATA ATT ATG GGT TTG GAT ATG TTA GCT AAT ATG
trp asp ser ser ser his asn thr val phe arg lys gly ile met gly leu leu asp met leu ala asn met
ACT AAC GAC CCA AAA GTA GTA CAG ACA TTA AAT TTA TAT AAA CAA ACG CAA ATT AAT CTC ATG GAT TCG TAT GTA
thr asn asp pro lys val val gln thr leu asn leu tyr lys gln thr gln ile asn leu met asp ser tyr val
CAA ATA CCG GAC GGC AAC GTG ATA AAA AAG ATT CAG TAT GGA GCT GTG GCT TCA GGT GAA AAA CAA ACT AAA GCG
gln ile pro asp gly glu ser val lys lys ile gln tyr gly ala val phe arg lys glu lys gln thr lys ala
GCT AAT TCT ATA GCT AAC TTA GCA CTC ATC AAA ACA GTA CTT TCA AGA ATT GCA AAC AAA TAT TCC TTT ATA ACT
ala asn ser ile ala asn leu ala leu ile lys thr val leu ser arg ile ala asn lys tyr ser phe ile thr

AAA ATA ATC AGA GTT GAT GGT GAT GAT AAC TAT GCG GTA TTA CAA TTT AAC ACT GAT GTG ACT AAA CAA ATG GTA
 lys ile ile arg val asp gly asp asp asn tyr ala val leu gln phe asn thr asp val thr lys gln met val
 CAG GAA GTA TCA AAT GAT GTA AGA TAT ATA TAC TCT AGA ATG AAT GCG AAA GTA AAA GCT TTG GTG TCT ACG GTC
 gln glu val ser asn asp val arg tyr ile tyr ser arg met asn ala lys val lys ala leu val ser thr val
 GGC ATT GAA ATA GCG AAA AGA TAT ATA GCT GGA GGG AAA ATA TTT TTC AGA GCT GGT ATA AAT TTA TTG AAT AAT
 gly ile glu ile ala lys arg tyr ile ala gly gly lys ile phe phe arg ala gly ile asn leu leu asn asn
 GAA AAA CGT GGA CAG AGC ACA CAA TGG GAT CAG GCT GCT ATT TTA TAT TCA AAC TAC ATT GTA AAT AAA TTG CGA
 glu lys arg gly gln ser thr gln trp asp gln ala ala ile leu tyr ser asn tyr ile val asn lys leu arg
 GGT TTT GAT GAT ACT AGA GAA TTC ATA TTA ACT AAA ATT ATA CAA ATG ACA TCT GTT GCT ATT ACT GGG TCG TTG
 gly phe asp thr asp arg glu phe ile leu thr lys ile gln met thr ser val ala ile thr gly ser leu
 AGG TTA TTC CCA TCA GAA CGA GTA CTG ACA ACC AAT TCT ACA TTC AAA GTT TTT GAC TCT GAA GAT TTT ATC ATA
 arg leu phe pro ser glu arg val leu thr thr asn ser thr phe lys val phe asp ser glu asp phe ile ile
 GAG TAT GGA ACG ACC GAT GAT GAA GTA TAT TAC ATT CAG AGA GCA TTT ATG TCA TTA TCT AGT CAG AAA TCA GGA ATA
 glu tyr gly thr asp asp glu val tyr ile gln arg ala phe met ser leu ser ser gln lys TCA GGA ATA
 GCT GAT GAA ATT GCT TCT TCA CAG ACA TTT AAA AAT TAT GTC AGT AAA TTA TCT GAT CAG TTA CTA GTA TCA AAA
 ala asp glu ile ala ser ser gln thr phe lys asn tyr val ser lys leu ser asp gln leu leu val ser lys
 AAC GCA ATT GTA TCT AAA GGT ATA GCA GTA ACA GAG AAA GCG AAA TTG AAC TCG TAT GCA CCA GTT TAT TTA GAG
 asn ala ile val ser lys gly ile ala val thr glu lys ala lys leu asn ser tyr ala pro val tyr leu glu
 AAA CGT GCG GCT CAA ATA TCC GCA TTA TTG ACC ATG CTA CAA AAG CCA GTA TCA TTT AAA TCA AAC AAA ATT ACA
 lys arg arg ala gln ile ser ser gln thr phe thr met leu gln lys pro val ser phe lys ser asn lys ile thr
 ATT AAC GAT ATC TTG GCG GAT ATA AAA CCA TTC TTT GTA ACT ACC GAA GCT AAA TTA CCA ATT CAA TAT AGA AAA
 ile asn asp ile leu arg asp ile lys pro phe phe val thr thr glu ala lys leu pro ile gln tyr arg lys
 TTT ATG CCT ACG TTA CCT GAT AAC GTT CAA TAT GTT ATA CAA TGC ATA GGA TCA CCG ACC TAT CAA ATA GAA GAT
 phe met pro thr leu pro asp asn val gln tyr val ile gln cys ile gly ser arg thr tyr gln ile glu asp
 AGT GGA TCA AAG TCA TCT ATT TCA AAG TTA ATA TCA AAA TAT TCA GTT TAT AAA CCA TCA ATT GAA GAA TTA TAT
 ser gly ser lys ser ser ile ser lys leu ile ser lys tyr ser val tyr lys pro ser ile glu glu leu tyr
 AAG GTA ATA TCT CTG CGA GAA CAG GAA ATA CAA TTG TAT TTA GTT TCA TTA GGA GTT CCA CCA GTT GAT GCA GCG
 lys val ile ser leu arg glu gln glu ile gln leu tyr leu val ser leu gly val pro pro val asp ala gly
 ACG TAT GTC GGA TCC AGG ATA TAT TCA CAA GAT AAA TAC AAA ATA CTT GAA TCT TAC GTA TAC AAT TTA TTA TCC
 thr tyr val gly ser arg ile tyr ser gln asp lys tyr lys ile leu glu ser tyr val tyr asn leu leu ser
 ATC AAT TAT GGA TGT TAT CAG TTA TTT GAT TTC AAT TCT CCA GAT CTA GAA AAG CTC ATT CCG ATT CCA TTT AAA
 ile asn tyr gly cys tyr gln leu phe asp phe asn ser pro asp leu glu lys leu ile arg ile pro phe lys
 GGT AAG ATA CCA GCA GTG ACG TTT ATA TTG CAT CTT TAC GCT AAA CTT GAA ATA ATA AAT TAT GCT ATT AAA AAC
 gly lys ile pro ala val thr phe ile leu his leu tyr ala lys leu glu ile ile asn tyr ala ile lys asn
 AAA TCT TGG ATT AGT TTA TTT TGT AAT TAC CCA AAG TCC GAA ATG ATT AAA TTA TGG AAG AAA ATG TGG AAT ATA
 lys ser trp ile ser leu phe cys asn tyr pro lys ser glu met ile lys leu trp lys lys met trp asn ile
 ACA GCA TTA CGA TCA CCT TAT ACT AGT GCT AAC TTC TTT CAG GAT TAG AGC GCT TAG ATG TGA CC
 thr ala leu arg ser pro tyr thr ser ala asn phe phe gln asp

Figura 10. Secuencia de nucleótidos del gene 1 de rotavirus porcino YM. La figura muestra la secuencia de nucleótidos, así como la secuencia de aminoácidos deducida de la primera. Se observa un solo marco de lectura abierto, y secuencias no codificadoras en los extremos 5' y 3' de 18 y 20 pb. respectivamente.

	<u>YM</u>	<u>Gottfried</u>	<u>RF</u>	<u>UK</u>
YM				
Gottfried	87			
RF	78	78		
UK	78	78	93	
SA11	78	77	85	85

Tabla 1. Comparación a nivel de nucleótidos entre los diferentes genes 1 de rotavirus. Se muestra el porcentaje de homología entre secuencias de nucleótidos del gene 1 de diferentes cepas; YM (porcino), Gottfried (porcino), RF (bovino), UK (bovino), y SA11 (simio).

	<u>YM</u>	<u>Gottfried</u>	<u>RF</u>	<u>UK</u>
YM				
Gottfried	97			
RF	90	90		
UK	90	90	98	
SA11	89	89	97	96

Tabla 2. Comparación a nivel de aminoácidos entre las diferentes proteínas de rotavirus. Se muestra el porcentaje de homología entre las proteínas VP1 de diferentes cepas de rotavirus; YM (porcino), Gottfried (porcino), RF (bovino), UK (bovino) y SA11 (simio).

1 100

Po/YM MGYNTLILSEYLSFVYNSQSAVQIPYYSSNSELEKRCIDFHAKCVDNSKGLSLSLFEYKDVIDNATLLSLSYSYDKYNAVERKLIYAKGKPLEA

Po/GOTT -----P-----KP-----D-----E-----S-----LE-----N-----R-----RK-----T-----S-----E-----VR-----

Bo/UK -----I-----N-----E-----S-----LE-----N-----R-----KK-----V-----S-----ME-----VK-----

Bo/RF -----I-----N-----E-----S-----LE-----N-----R-----KK-----V-----N-----E-----VK-----

S1/SA11 -----I-----N-----E-----S-----LE-----N-----R-----KK-----V-----N-----E-----VK-----

101 200

Po/YM DLTANELDYENKKTSELFKSAEYEDSLDHPDALTSISSNLANVWFMRHSNDVGDANKVYRRRDLDFLIIVASGTINKYGVPRINEKRYVEYEVKMKP

Po/GOTT -----D-----K-----Y-----L-----L-----L-----K-----E-----AEKL-----I-----K-----T-----V-----A-----D-----

Bo/UK G-V-----PT-----L-----L-----K-----E-----AEKL-----I-----K-----T-----V-----A-----A-----

Bo/RF -----V-----PT-----L-----L-----K-----E-----AEKL-----I-----K-----T-----V-----A-----A-----

S1/SA11 -----PT-----L-----L-----K-----E-----AEKL-----K-----T-----A-----D-----D-----

201 300

Po/YM YLIVTWANSAIEHLMSVFSHEDYLIAKELIILSYNSRSTLAKLVSSPMSIILVALIDINGTFITNEELELEFSDKYVKAIVPDQTFNELQEMIDNKKAGL

Po/GOTT -----MV-----C-----A-----I-----K-----T-----FD-----R-----R-----D-----NQ-----L-----R-----

Bo/UK -----S-----R-----V-----V-----V-----N-----R-----R-----D-----NQ-----L-----R-----

Bo/RF -----S-----R-----V-----V-----V-----N-----R-----R-----D-----NQ-----L-----R-----

S1/SA11 -----S-----D-----V-----V-----V-----N-----LR-----D-----NQ-----L-----R-----

301 400

Po/YM VDIPRMIEMLVDCSLEXFTLMSKRIYSWHSFVGRKQRMIDALDQLKTEYTEDVDNEHYNEYTHLIRDEIVRMLEVPKHDDHLLRDELSQLGSSSA

Po/GOTT -----A-----M-----N-----C-----L-----A-----I-----K-----T-----FD-----R-----R-----D-----NQ-----L-----R-----

Bo/UK T--K--D-----I-----P-----A-----L-----L-----D-----R-----V-----E-----C-----

Bo/RF T--K--D-----I-----P-----A-----L-----L-----D-----R-----V-----E-----C-----

S1/SA11 --K--D--R--I--P--A-----L--CAGT--N--D--R--V--E-----

401 500

Po/YM SNGESRQLKGRKRTIFSTKKNHVMDDIANGRYTPGVIPPVNVDRPIPLGRARDVPRGRTRIIIFILPYEYNASQHAVVEKHSYAKHTREYAEFYSSQSZL

Po/GOTT -----A-----M-----N-----I-----K-----I-----K-----T-----FI-----I-----I-----

Bo/UK -----M-----N-----I-----K-----I-----K-----T-----FI-----I-----I-----

Bo/RF -----M-----N-----I-----K-----I-----K-----T-----FI-----I-----I-----

S1/SA11 -----M-----N-----I-----K-----I-----K-----T-----FI-----I-----I-----

501 600

Po/YM LSYGDTVTRFLSSNMLVYTVSQCWDSSQHNTQPPFRKGIIMGLDLNANTNDPKVQVTLNLVYQQTQINLMDSYVQIPDGNVIKIKIQYGAVASGEKTKAAN

Po/GOTT -----N-----A-----AR-----I-----D-----

Bo/UK -----N-----A-----AR-----I-----D-----

Bo/RF -----N-----A-----AR-----I-----D-----

S1/SA11 -----N-----T-----I-----A-----L-----

601 700

Po/YM SIANLALIKTVLSRIANKYSFITKILRVGDGNNYVLPQNTDVTQMVQEVSDVRIYSRMAKRVKALVSTVCIETAKRYIAGCKIFRAGINLLNKK

Po/GOTT -----S-----A-----E-----D-----ET-----A-----

Bo/UK -----S-----A-----E-----D-----ET-----A-----

Bo/RF -----S-----H-----A-----E-----I-----D-----ET-----A-----

S1/SA11 -----S-----H-----A-----E-----I-----D-----ET-----A-----

701 800

Po/YM RGQSTQMDQAAILYSNHYVKNLKGFDTRDEFILTKIQMTSVAITOSLRLPSPSERVLTNSTKRVFSDSEDFIIEYGTDTDEVVYIQRAFHSLSQKSGIAD

Po/GOTT -----V-----R-----E-----N-----H-----

Bo/UK -----V-----R-----E-----N-----H-----

Bo/RF -----V-----R-----E-----N-----H-----

S1/SA11 -----R-----E-----N-----H-----

801 900

Po/YM EIASSTFKNYVSKLSDQLLVSKNAIVSIOAVTEKAKLNSVAPVYLEKRAAQISALLTHLQKVPVFKSUKITINDILRDIKPFFVYTAKLPYQYRKH

Po/GOTT -----A-----S-----E-----F-----N-----R-----L-----IS-----T-----S-----TVS-----H-----Q-----

Bo/UK -----A-----S-----E-----F-----N-----R-----L-----IS-----T-----S-----TVN-----H-----Q-----

Bo/RF -----A-----S-----E-----F-----N-----R-----L-----IS-----T-----S-----TVSD-----H-----Q-----

S1/SA11 -----A-----S-----TR-----E-----F-----N-----R-----L-----IS-----T-----S-----TVSD-----H-----Q-----

901 1000

Po/YM PTLPNQVWVIQIGSRTYIQEDSGSKSISKLIKSYSVVKPSEIELVKVISLRLBEQIQLVYLSLGVPPVADGTVSGSRIYSQDHYKILLESYVYMLNLSIN

Po/GOTT -----I-----D-----A-----R-----R-----H-----N-----I-----I-----KI-----D-----K-----R-----

Bo/UK -----I-----D-----A-----R-----R-----H-----N-----I-----I-----KI-----D-----K-----R-----

Bo/RF -----I-----D-----A-----R-----R-----H-----N-----I-----I-----KI-----D-----K-----R-----

S1/SA11 -----I-----D-----A-----R-----R-----H-----N-----I-----I-----KI-----D-----K-----R-----

1001 1088

Po/YM YGCYQLFDENSPDLEKLRIRIPFKGIKPAVITLHLVAKLEIIINVAIKNKSWSLFCNYPKSEMILKWKMMNITALRSPYTSANFFQD

Po/GOTT -----V-----H-----G-----F-----S-----N-----E-----

Bo/UK -----V-----H-----G-----F-----S-----N-----E-----

Bo/RF -----V-----H-----G-----F-----S-----N-----E-----

S1/SA11 -----V-----H-----G-----F-----S-----N-----E-----

Figura 11. Comparación de las secuencias de aminoácidos entre las diferentes proteínas VP1 de rotavirus. La figura muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína VP1 del rotavirus YM y las diferencias encontradas con las cepas Gottfried (cerdo), RF (bovino), UK (bovino) y SA11 (simio); los guiones indican identidad.

Cuando comparamos las secuencias de aminoácidos de las proteínas VP1 de YM, Gottfried, UK, RF, SA11 (grupo A) y Cowden (6) (grupo C), con la posible RNA polimerasas de reovirus (45), se observan ocho motivos estructurales que se conservan entre proteínas de rotavirus del grupo A, y del grupo C. Los motivos 1 (D), 2 (SG.T), y 3 (GDD), en las posiciones: 520-525, 591-604, y 610-612 respectivamente fueron descritos previamente (8, 10, 18, 39). El motivo 4 (D.AA) en la posición 751-753 corresponde con el motivo 5 que reportó anteriormente Fukuhara (18), el motivo 5 básico (K) corresponde con el motivo 4 reportado por Bruenn (8) en la posición 735, el motivo 6 (RLFP) corresponde con el 5 y 6 de Bruenn y Fukuhara respectivamente (8, 18), el motivo 7 (FKS) en la posición 876-878 corresponde al 7 reportado por Bruenn (8), y por último el motivo 8, en la posición 882-884 corresponde al 8 y 7 de Bruenn y Fukuhara respectivamente (8, 18), (los motivos 6 de Bruenn , y 4 de Poch y Fukuhara no se observan) (figura 12. Comparar con el anexo)

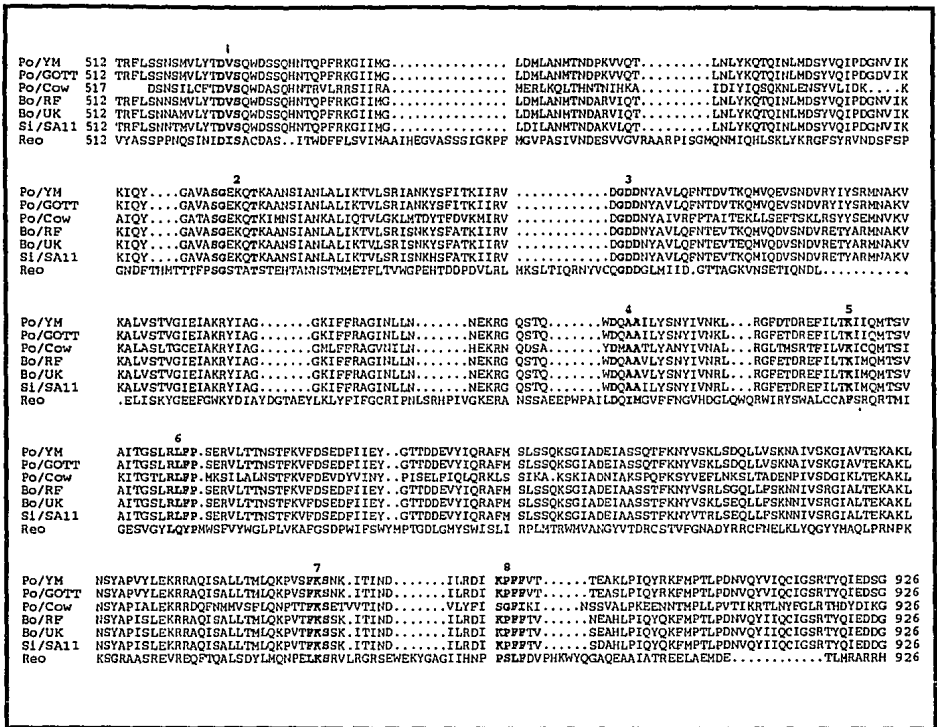


Figura 12. Localización de motivos estructurales característicos de RPDR. El alineamiento de la mitad carboxilo terminal de las proteínas VP1 de diferentes cepas (YM, Gottfried, RF, UK, YC, y SA11) y grupos (A y C) de rotavirus, así como también de reovirus (virus con genoma de dcRNA, de la familia *Reoviridae*), permitió la identificación de ocho motivos característicos de RPDRs.

DISCUSION

En este trabajo, se hace la caracterización molecular del gene 1 de rotavirus YM. Diferentes construcciones, así como también oligonucleótidos sintéticos, fueron utilizados para determinar la secuencia completa de la cadena positiva del gene 1. El alto porcentaje de homología a nivel de nucleótidos y de proteínas (87 % y 98 % respectivamente) encontrado entre YM y Gottfried, indica como era de esperarse dado su origen, que YM se encuentra más relacionado con la cepa porcina que con las de bovino y de simio.

Por otro lado la comparación, de la secuencia de aminoácidos de VP1 con otras proteínas que tienen actividad de RNA polimerasas (RPDR), nos muestra que la secuencia de VP1 de YM, contiene motivos característicos de RPDRs, además estos motivos son conservados en las proteínas VP1 de rotavirus del grupo A (Gottfried, RF, UK, y SA11) como en proteínas VP1 de rotavirus del grupo C. La comparación de secuencias de proteínas, deducida de las secuencias de los genes de diferentes cepas o grupos, pueden ser útiles para definir los dominios funcionales y/o antigénicos de esta proteína de rotavirus.

La comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas VP1, de los grupos A y C indicó un 48.2 % de homología, enfatizando el importante papel de los ocho motifs conservados en la actividad de polimerasa dado que son estrictamente conservados entre diferentes virus de dcRNA (6, 10, 18, 34, 44, 45).

La identidad de la replicasa y transcriptasa viral en rotavirus se desconoce, pero como las partículas con actividad de replicasa contienen proteínas que se encuentran en

partículas con actividad de transcriptasa (35), la o las mismas proteínas pueden tener ambas funciones.

Lo anterior indica la necesidad de realizar ensayos funcionales con la proteína VP1 completa, con el fin de constatar si tiene actividad de polimerasa, no obstante aún que se demostrara que VP1 tiene actividad de polimerasa, no se descartaría la posibilidad de una asociación con otras proteínas no estructurales, y estructurales conformando un complejo enzimático responsable de los procesos de transcripción y/o replicación.

El motivo 4 descrito por Bruenn (8) no coincide en posición con el descrito previamente por Poch y por Fukuhara (18, 39). En ambos casos se trata de un residuo básico (K), pero en el caso del descrito por Poch y por Fukuhara éste se encuentra aproximadamente 30 bases adelante del GDD, mientras que el descrito por Bruen se encuentra localizado aproximadamente 120 bases adelante del mismo motivo. Cuando nosotros comparamos las proteínas VP1s de las cepas del grupo A y del grupo C, encontramos presentes los dos motivos en las posiciones descritas, pero cuando además comparamos con reovirus, entonces ya no se observa el motivo descrito por Poch y por Fukuhara, y se sigue conservando el motivo descrito por Bruenn. Lo anterior sugiere la presencia de dos motivos básicos independientes presentes en RPDRs, no obstante su desaparición cuando en la comparación se incluye a reovirus ya que cuando se hacen los alineamientos existe una gran variación debido a que no existen parámetros fijos establecidos que validen hasta que límite es significativa ó no una comparación. Por otro lado también es de tomarse en cuenta que la existencia de varios motivos conservados entre las diferentes cepas, y grupos, no es una indicación de que los motivos sean característicos de RPDR sino que se deben a su cercanía en la escala filogenética, de cualquier modo es bastante claro que el motivo GDD si se encuentra

presente en todas las comparaciones, corroborando una vez más la importancia de este motivo en las RPDRs.

CONCLUSIONES.

- 1 Se determinó la secuencia completa de nucleótidos del gene 1 del rotavirus YM.
- 2 El gene 1 de YM codifica para una proteína de 1088 aminoácidos con un PM calculado de 134 Kd. y una carga neta de 15.5 a pH 7.0.
- 3 La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos obtenida, contiene los motivos estructurales descritos en las proteínas que funcionan como RNA polimerasas dependientes de RNA.

BIBLIOGRAFIA.

1. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*. (eds.). Wiley Interscience.
2. Adams, W. R., and Kraft, L., M. 1963. Epizzotic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science*. 141:359.
3. Argos, P. 1988. A sequence motif in many polymerases. *Nucleic Acids Research*. 16:9909.
4. Bastardo, J. W., B. J. McKimm, S. Sonza, L. D. Mercer, and I. H. Holmes. 1981. Preparation and characterization of antisera to electrophoretically purified SA11 virus polypeptides. *Infect. Immun.* 34:641.
5. Bishop, R. F., G. P. Davidson, I. H. Holmes, and B. J. Ruck. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet*. 2:1281.
6. Bremont, M., A. Charpilienne, and J. Cohen. 1992. Sequences of the Four Larger Proteins of a Porcine Group C Rotavirus and Comparison with the Equivalent Group A Rotavirus Proteins. *Virology*. 186:684.
7. Brown, D. W., M. M. Mathan, M. Mathew, R. Martin, G. M. Beards, and V. I. Mathan. 1988. Rotavirus epidemiology in Vellore, south India: group, subgroup, serotype, and electrophoretype. *J. Clin. Microbiol.* 26:2410.
8. Bruenn, J. A. 1991. Relationships among the positive strand and double-strand RNA viruses as viewed through their RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Research*. 19:217.
9. Cohen, J. 1977. Ribonucleic acid polymerase activity associated with purified calf rotavirus. *J. Gen. Virol.* 36:395.

10. Cohen, J., A. Charpilienne, S. Chilmonczyk, and M. K. Estes. 1989. Nucleotide sequence of bovine rotavirus gene 1 and expression of the gene product in baculovirus. *Virology*. 171:131.
11. Cohen, J., J. Laporte, A. Charpilienne, and R. Scherrer. 1979. Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch. Virol.* 60:177.
12. Cukor, G. and N. R. Blacklow. 1984. Human viral gastroenteritis. *Microbiol. Rev.* 48:157.
13. Eiden, J., S. Vonderfecht, K. Theil, M. A. Torres, and R. H. Yolken. 1986. Genetic and antigenic relatedness of human and animal strains of antigenically distinct rotaviruses. *J. Infect. Dis.* 154:972.
14. Ernst, H. a. and J. A. Duhl. 1989. Nucleotide sequence of genomic segment 2 of the human rotavirus Wa. *Nucleic Acids Researchn.* 17:4382.
15. Estes, M. K. and J. Cohen. 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 53:410.
16. Estes, M. K., E. L. Palmer, and J. F. Obijeski. 1983. Rotaviruses: a review. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 105:123.
17. Flewett, T. H., A. S. Bryden, H. Davies, G. N. Woode, J. C. Bridger, and J. M. Derrick. 1974. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* 2: 61.
18. Fukuhara, N., K. Nishikawa, M. Gorziglia, and A. Z. Kapikian. 1989. Nucleotide sequence of gene segment 1 of a porcine rotavirus strain. *Virology*. 173:743.
19. Gallegos, C. O. and J. T. Patton. 1989. Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology*. 172:616.
20. Gombold, J. L.'and R. F. Ramig. 1987. Assignment of simian rotavirus SA11 temperature-sensitive mutant groups A, C, F, and G to genome segments. *Virology*. 161:463.

21. Greenberg, H., V. McAuliffe, J. Valdesuso, R. Wyatt, J. Flores, A. Kalica, Y. Hoshino, and N. Singh. 1983. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 39:91.
22. Helmberger, J. M. and J. T. Patton. 1986. Characterization of subviral particles in cells infected with simian rotavirus SA11. *Virology.* 155:655.
23. Kamer, G. a. and P. Argos. 1984. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Research.* 12:7269.
24. Kapahnke, R., W. Rappold, U. Desselberger, and D. Riesner. 1986. The stiffness of dsRNA: hydrodynamic studies on fluorescence-labelled RNA segments of bovine rotavirus. *Nucleic Acids Research.* 14:3215.
25. Kapikian, A. Z. and R. M. Chanock. 1985. Rotaviruses. 863-903. *In* B. N. Fields, D. N. Knipe, J. L. Melnick, R. M. Chanock, B. Roizman, and R. E. Shope (eds.), *Rotaviruses.* Raven Press, New York.
26. Kozak, M. 1984. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukariotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 12:5233-5252.
27. Kumar, A., A. a. Charpilienne, and J. Cohen. 1989. Nucleotide sequence of the gene encoding for the RNA binding protein (VP2) of RF bovine rotavirus. *Nucleic Acids Research.* 17:2126.
28. Liu, M. and M. K. Estes. 1989. Nucleotide sequence of the simian rotavirus SA11 genome segment 3. *Nucleic Acids Research.* 17:7991.
29. Liu, M., N. M. a. Mattion, and M. K. Estes. 1992. Rotavirus VP3 Expressed in Insect Cells Possesses Guanylyltransferase Activity. *Virology.* 188:77.
30. Liu, M., P. A. Offit, and M. K. Estes. 1988. Identification of the simian rotavirus SA11 genome segment 3 product. *Virology.* 163:26.

31. López I. 1989. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. UACFP. CCH. UNAM.
32. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. *Molecular Cloning: A lab manual.* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989).
33. Mesing, J. New M13 vectors for cloning. *Methods in Enzymology* 1983, vol. 101.
34. Mitchell, D. B. and G. W. Both. 1990. Completion of the genomic sequence of the simian rotavirus SA11: nucleotide sequences of segments 1, 2, and 3. *Virology.* 177:324.
35. Patton, J. T. and C. O. Gallegos. 1988. Structure and protein composition of the rotavirus replicase particle. *Virology.* 166:358.
36. Patton, J. T. and C. O. Gallegos. 1990. Rotavirus RNA replication: single-stranded RNA extends from the replicase particle. *J.Gen.Virol.* 71:1087.
37. Pedley, S., J. C. Bridger, J. F. Brown, and M. A. McCrae. 1983. Molecular characterization of rotaviruses with distinct group antigens. *J. Gen. Virol.* 64:2093.
38. Pizarro, J. L., A. M. Sandino, J. M. Pizarro, J. Fernandez, and E. Spencer. 1991. Characterization of rotavirus guanylyltransferase activity associated with polypeptide VP3. *J. Gen. Virol.* 72:325.
39. Poch, O., I. Sauvaget, M. a. Delarue, and N. Tordo. 1989. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO Journal.* 8:3867.
40. Prasad, B. V., G. J. Wang, J. P. Clerx, and W. Chiu. 1988. Three-dimensional structure of rotavirus. *J. Mol. Biol.* 199:269.
41. Ramig, R. F. and B. L. Petrie. 1984. Characterization of temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11: protein synthesis and morphogenesis. *J. Virol.* 49:665.
42. Sandino, A. M., M. Jashes, G. Faundez, and E. Spencer. 1986. Role of the inner protein capsid on in vitro human rotavirus transcription. *J. Virol.* 60:797.

43. Snodgrass, D. R., A. J. Herring, I. Campbell, J. M. Inglis, and F. D. Hargreaves. 1984. Comparison of atypical rotaviruses from calves, piglets, lambs and man. *J. Gen. Virol.* 65:909
44. Tarlow, O. and M. A. and McCrae. 1990. Nucleotide sequence of gene 1 of the UK tissue culture adapted strain of bovine rotavirus. *Nucleic Acids Research.* 18:7150.
45. Wiener, J., R. and K. J. and Wolfgang. 1989. The Sequences of the Reovirus Serotype 1, 2, y 3 L1 Genome Segments and Analysis of the Mode of Divergence of the Reovirus Serotypes. *Virology.* 169:194.

ANEXO.

										RUA-REP RNA POL						
NSIV	249	VDSGLATI	D	LSASADGI	30	LRHMLFLSTN	G	NGPT..FELESNIPOLIV	12	IGIYGD	DD	IICP	12	YGFPL..NLR	K	TF
QAV	252	TDGLLATI	D	LSASADGI	30	LRHMLFLSTN	G	NGPT..FELESNIPOLIS	12	LGIVGD	DD	IIVP	12	AVYPL..NLR	K	TF
QDAVL	246	VTRVLATI	D	LSASADGI	31	VYTRKELSG	G	NGPT..FELESIFAGIA	13	VTVGD	DD	IILP	12	YGFPT..NTR	K	TF
PolV	1973	NEKFLIAP	D	VTG..YDAS	38	TYCVYGGQD	G	CSGT..SIFPKSHNIIII	17	MIAYG	DD	VIAS	15	DTGLMFTAD	K	SA
CoV	1848	LDGLLIAP	D	YSG..YDAS	39	HTFYVGGQD	G	CSGT..SIFPKSHNIIII	17	MIAYG	DD	VIAS	15	DTGLMFTAD	K	GE
HRV1	1944	HDGLLIAP	D	YSH..YDAS	37	TYVYVGGQD	G	CSGT..SIFPKSHNIIII	17	ILAYG	DD	LVAI	15	NYGLITTFPD	K	SE
HRV2	1916	SDKSHAP	D	YTH..YDAS	36	TYDYGQD	G	CSGT..SIFPKSHNIIII	17	ILAYG	DD	VYPS	15	RYGLITTFAD	K	SE
ENVY	2057	GEFVYDVI	D	YSH..YDGT	41	RLITLGLFL	G	CAAT..SHLITRNIIII	17	VLSYG	DD	LVAI	15	RYGLITTFAN	T	TS
PCMV	2095	QYRNMDVI	D	YSH..YDAN	41	RLITVGGQD	G	CAAT..SHLITRNIIII	17	HLSYG	DD	IWA	15	SLGITTFAD	K	SD
NAV	1974	YDGLLIAP	D	YFA..YDAS	41	CVYVGGQD	G	SCT..ALLESIIHNIN	20	ILCTG	DD	VLVY	22	KLDTATAD	K	HW
CPV	1427	KONVLIAC	D	YSS..YDGL	44	YMWVCCIP	G	PNVY..VIVGIVRLEII	26	LVTVG	DD	NLIS	20	GVITITDGD	K	TS
BV	579	CDACVIT	D	YSH..LDIR	45	RIEYVGVRS	G	SSTY..YPRVQVQVCE	20	GRKCG	DD	GLSR	8	RAAKCTGEL	K	VE
TEV	2519	SDYVYDA	D	GGQ..YDGS	45	ILIKKGGNS	G	QPTT..VDRITLITAM	15	YTVG	DD	LVAI	21	RYGLITTFAD	K	TQ
TYMV	2441	SDYVYDA	D	GGQ..YDGS	45	YVYKGGNS	G	QPTT..VDRITLITAM	19	FFVAG	DD	LVAI	21	RYGLITTFAD	K	RE
TRV	366	CFYVYDVI	D	YSH..YDAS	41	RY..YDTPAS	G	CAAT..SHLITRNIIII	17	VLSYG	DD	LLIG	15	RYGLITTFAN	K	TF
SiH	1284	QSDPVLIT	D	IAS..YDAS	42	RYFVCAVDS	G	NFLT..LFTVTVLAVIA	13	AAFIQ	DD	NVH	10	RCASVWDEV	K	II
HLV	746	PGDVLIT	D	IAS..YDAS	42	RYFVCAVDS	G	NFLT..LFTVTVLAVIA	13	AAFIQ	DD	NVH	10	RCASVWDEV	K	II
SPV	2110	PGDVLIT	D	IAS..YDAS	42	RYFVCAVDS	G	NFLT..LFTVTVLAVIA	13	AAFIQ	DD	NVH	10	RCASVWDEV	K	II
TRV	1377	VHVDLLEL	D	ISA..YDGS	42	KTCVNDGAS	G	DMPT..YIGVTVLAAEL	11	GAFCG	DD	SLLY	12	SMTLWYFA	K	LD
BTVV	1833	SDAIVHVI	D	AAA..YDGS	40	RANVYVYTG	G	ENPT..LGGTIVLQDGL	11	PAVGG	DD	GFSD	12	RLITLWYLF	K	LD
RV	457	RRVYVLEA	D	LAK..YDAS	42	QGVSYFQMT	G	DAFT..YIGVTVLAVI	11	ALFSG	DD	SLLI	10	MPTLWYFA	K	WV
TRV	20	ANTVYVVI	D	NSR..YDAS	42	NAHIVYQAS	G	DAFT..YIGVTVLAVI	11	VTVGG	DD	SLLI	12	RLATWYFIC	K	IF
AAV	512	ADYVYVVI	D	YFA..YDAS	42	YVYVYVYVYV	G	DAFT..YIGVTVLAVI	11	VYVAG	DD	SLLI	11	LPVTVVLEA	K	IF
CUOV	506	LVKQVLEI	D	LQR..YDGS	42	QNPISFQMT	G	DAFT..YIGVTVLAVI	11	LLFSG	DD	SLLI	10	RYGLITTFAN	K	WV
TRV	1570	KYVYVLIAN	D	YTA..YDAS	36	POVITVQVLT	G	ENPT..YIGVTVLAVI	10	IMVSG	DD	SLLI	10	SVLWYVYVLF	K	IF
BTV	559	ACVYVYVVI	D	NSR..YDAN	43	RYFVCAVDS	G	DMPT..SMTLWYVQVW	12	LQDGG	DD	CVII	23	VYVYVYVLE	K	IF
CoVH	446	QVYVYVVI	D	NSR..YDAN	44	RYTVKGGNS	G	DMPT..ALGELVLAELT	9	LNRG	DD	CVLI	24	LAKEVYDCE	K	IR
YFV	1033	QGGVYVVI	D	YAG..YDTR	51	VISKEDGGAS	G	QVVT..YALGTVLAVI	41	MAVSG	DD	CVVY	7	LALSHLVANS	K	VR
RV	3853	PGKVVYVVI	D	YAG..YDTR	51	VISKEDGGAS	G	QVVT..YALGTVLAVI	41	MAVSG	DD	CVVY	7	TSVIVYVYV	K	VR
EBV	407	NSVYVYVVI	D	LEK..YDAN	51	LQIVKTVGGG	G	NAAT..YFVHSLVLEVL	28	IGRSI	DD	IRGK	29	LQVMA..YYS	K	DL
TRV	610	QVTVLIIII	D	YCY..YDGR	67	GLALDITHL	G	ENST..LJAGVDRVAVG	19	QVYVQ	DD	TLFY	23	KQVIA..SPS	K	TH
INF	297	EISVITIG	D	MYK..YHNS	83	LIDGTASLSE	G	MPGQ..YFR..RLSTVIG	19	GLOSS	DD	FALI	21	LQVIM..SKK	K	ST
INF	297	GISHVYVQ	D	MYK..YHNS	84	RLGGVYVLSR	G	MPGQ..YFR..RLSTVIG	17	GLOSS	DD	FALI	21	LQVIM..SKK	K	ST
LCV	1143	EDVYVYVVI	D	NSR..YDTR	85	RIEGLVDSG	G	ILON..LSD..YVGLS	13	AYTES	DD	QVTL	38	VAGVY..AEP	K	SR
TACV	1180	MDGLVLEL	D	NSR..YDGT	87	RIEGLVDSG	G	ILON..LSD..YVGLIT	13	STYSS	DD	QVTL	38	VAGVY..AEP	K	SR
NDV	833	RYAVYVIT	D	LQR..YVLM	56	RODITVYVSA	G	GLED..LQV..KQVLES	16	CVVQD	DD	QVIA	59	KDGLIYVQL	K	NS
SHV	455	FLCVYVIT	D	LQR..YVLM	56	RODITVYVSA	G	GLED..LQV..KQVLES	16	AVVQD	DD	QVIA	59	KDGLIYVQL	K	NS
PhaV	654	YVAVYVIT	D	LQR..YVLM	56	RODITVYVSA	G	GLED..LQV..KQVLES	16	SLVQD	DD	QVIA	59	KDGLIYVQL	K	SI
RAV	610	RYVYVYVVI	D	YER..YHNS	57	RYGTVKQVQD	G	GLED..LQV..KQVLES	16	VLAQD	DD	QVIA	62	FRVTVYVPS	K	SI
YVY	597	YICLAVHI	D	YER..YHNS	55	SDYVYVYVYV	G	GLED..LQV..KQVLES	16	VLAQD	DD	QVIA	62	FRVTVYVPS	K	SI

Anexo 1. Motivos característicos de RDPRs, reportados por Poch, et. al. 1989. Los motivos se encuentran enmarcados, y los números después del nombre indican el primer aminoácido comparado. Se indica además la longitud que separa a cada motivo.

Carv Dns.RF..DQ HVSVALEFE HSYCLAEFE...GDNLAN LKHMVWNG
Dns.RF..DQ HVSVALEFE HSYCLAEFE...GDNLAN LKHMVWNG
Dns.RF..DQ HVSVALEFE HSYCLAEFE...GDNLAN LKHMVWNG

Carav DntALGNLCL LACLTKHM KR.....
Byd DINTSNGKRL IHCNQHVA KR.....
Pivc SYNTSSNSNR IRVMAYHCQ AD.....
Byw BYTSSNSNR IRVMAYHCQ AD.....

51 VcFA...S NQHLRYE... 100
Carv KhFV...E DMKLEKTV...GRMS-G
Pivv NsvLCL...S DQTLAKVA...PGVCR-S-G
Byw NsvLCL...S DQTLAQIH...PGVCR-S-G

151 ...SRLN HGGDDVCLC ERDTE...
Carv -GV-LEAM-G HGGDDVCLC ERDTE...
Byw -HAM AGOADALEAP NSDLE...
Pivc -HAM AGOADALEAP NSDLE...

201
 Ccmv
 Bdvw
 Plrv
 Cdv
 Cylv
 Mcmv
 Pvk
 Tmrv
 Yfv
 Mnv
 Dengue
 Jev
 Hcv
 Hbv
 Tsv
 Tdv
 Cpsv
 Tmrv
 Hcv
 Bnyrv
 Tsv
 Mnv
 Bsmv
 Almv
 Bsmv
 Cucmv
 Slrv
 Cmv
 Rrv
 Rot
 Reo
 Ph16
 Hbv
 Bv
 Scv11
 Scv10
 Scv11
 Scv11
 Pol10
 Tmrv
 Hsv14
 Fadv
 Cxv
 Hsv
 Obeta
 Sp
 Hs2
 Ga
 NZ

250
 Ccmv
 Bdvw
 Plrv
 Cdv
 Cylv
 Mcmv
 Pvk
 Tmrv
 Yfv
 Mnv
 Dengue
 Jev
 Hcv
 Hbv
 Tsv
 Tdv
 Cpsv
 Tmrv
 Hcv
 Bnyrv
 Tsv
 Mnv
 Bsmv
 Almv
 Bsmv
 Cucmv
 Slrv
 Cmv
 Rrv
 Rot
 Reo
 Ph16
 Hbv
 Bv
 Scv11
 Scv10
 Scv11
 Scv11
 Pol10
 Tmrv
 Hsv14
 Fadv
 Cxv
 Hsv
 Obeta
 Sp
 Hs2
 Ga
 NZ

300
 Ccmv
 Bdvw
 Plrv
 Cdv
 Cylv
 Mcmv
 Pvk
 Tmrv
 Yfv
 Mnv
 Dengue
 Jev
 Hcv
 Hbv
 Tsv
 Tdv
 Cpsv
 Tmrv
 Hcv
 Bnyrv
 Tsv
 Mnv
 Bsmv
 Almv
 Bsmv
 Cucmv
 Slrv
 Cmv
 Rrv
 Rot
 Reo
 Ph16
 Hbv
 Bv
 Scv11
 Scv10
 Scv11
 Scv11
 Pol10
 Tmrv
 Hsv14
 Fadv
 Cxv
 Hsv
 Obeta
 Sp
 Hs2
 Ga
 NZ

350
 Ccmv
 Bdvw
 Plrv
 Cdv
 Cylv
 Mcmv
 Pvk
 Tmrv
 Yfv
 Mnv
 Dengue
 Jev
 Hcv
 Hbv
 Tsv
 Tdv
 Cpsv
 Tmrv
 Hcv
 Bnyrv
 Tsv
 Mnv
 Bsmv
 Almv
 Bsmv
 Cucmv
 Slrv
 Cmv
 Rrv
 Rot
 Reo
 Ph16
 Hbv
 Bv
 Scv11
 Scv10
 Scv11
 Scv11
 Pol10
 Tmrv
 Hsv14
 Fadv
 Cxv
 Hsv
 Obeta
 Sp
 Hs2
 Ga
 NZ

401
 Camv LKSAVCGCLR IA...GGV. PVV.GEYFK YVETA.....
 Blyv BRSVQCGV LH...AGV. PTL.ESTYAC LYRSD.....
 Flv ECGCP EVI. QHTLAA VFSVL.GELR HORELWVAV
 BnyvGCSHA EVV.SHYLAA CFSVL.NEIR HOPASVELLY
 Cnv SMAGHGVVA LT...SG.I PVV.EKFS.S RFLY.....
 Cvr SMAGHGVLA LS...AG.T PVV.EKFS.S RFLY.....
 Hcmv HRAVCGECLS LT...GCL. PVK.CEY.T ALVKH.....
 Pvk KRCQDSYDZ LSTA.VYDHK SLH.DLFEK .GC. QHAT LTCR.....
 Pvk RLSTLFTT GHT.LG.S SLH.HLFTT HLYVH.SG.FEYF.....
 YfvPCR.QGDE.....
 MnvPCR.QGDE.....
 Dengu JevPCR.QGDE.....
 HcvKHATRAL.....
 BdvFTPLDAA.....A
 Tav DMLVIRN YAVLGA. PTOGLAE.....
 Ppv KELLERIRK YSVLGEA.....PYNALSD.....
 Tdvv R.SATFSL YMLTFKSK HASRQSDQ GTVDVVEELI LNVNVALEL
 Cpvv KALRAGN YV.....CNCE. KEVAVLT.V KVVNV.LEL
 Tmv TDLIQIRRF YNTIQEQ.....PYRSLAE.....
 Tcv QHIAETYSLNDSHRA.....
 Bnyvv KIF.....GEVQK SLR.DWJSL HLYVH.SG.FEYF.....
 Tmv EHLEZFRRSLCDV AVSLNCAVYTQLDQAV MEVH.....
 Hbv
 Bsv EISELITSIKDFVRLDA LDKALDOR.....
 Alav IDEMYOJMIDIIG GP..NDHWHI RCVAAM.....TAHR.YL
 Bsv QHIAHVFVFCD.RM KFI.HOLDE. RHITTL.....CHFVYL
 Cucv DMLQFAIF HSF.VD.RM KFM.DRSGS CIGOL.....SIFV.LEE
 Slvv DEQDEARRA L...LDETK AM..FVAGIT GTLAVAV.....TTR
 Sfv DEQDEARRA L...SDEVS KM..FRIGLO ALEVAL.....TSR
 Cnv DEQDEARRA L...ADECV RM..ORGLV LEX.....VSR
 Rcv DTQDEARRA L..KDETD RM..ARVGL SELEIAL.....TSR
 Rot ALTKARML .SVA.....PISLEKRA.....
 Rco PFDGLWIM ISLIR PLMT.RANNA HMYDORCS TYPQ.....
 Ph16 GLAELTIDL EVLAD. PHLK.....QYKM.TEADV SA.....
 Ibdv PLDFLAEMS ELSEF.....GETP.....EGF.....
 Bdv SMOGDTLIR LIRN.....FLA.VYIG HNSVORCS TYPQ.....
 Scvll Y.NERTHYA RM.....GLAVSYA.N LKFNISFPA.A
 Scvla AYHERAVRIA MK.....GMSGLIV.N RIRM.GVS.....
 PolloPMPKPEHE SIRM.....
 EncPOMRASA HLYV.....
 TmvPCHADVIRA HVSY.....
 Hsv14PVPKPDHIE SIRM.....
 FadvPVAASKTIA HLYV.....
 CoavPAPKPDHIE SIRM.....
 HavPAISEKIMS LMAH.....
 Oqta RMYNDYD
 Sp RNCVYDCHDPRALTYEAK LKLL.....
 Hs2 CMCVCGHSDPRLTYKWRV SQOV.....
 Ga CMCVCGHSDPRLTYKREF ADM1.....

451
 CamvGKRE NKHITK.....SSSG FFMHA.....
 BlyvGKRV SEFTNWI.....SIC TDRLE.....
 Flv QMLV.PSATT KEH.....SLS.....
 Bnyv SMLVQVPLQ KIFCF.....
 CnvKRVKRM RM.R.DVYVAF KWR..GSGGN YHYVF..ES.RASFMAFGL
 CvrDMFVQK RI.DVYVNV KWR..GSGGN YHYVF..ES.RASFMAFGL
 HcmvGLDPR.....MIQO.GKD FD.....SGLY YLSKL.....
 Pvk TLISGRC. TVSL.....
 Tmv ERRCR.R.HE KMLLDSTPA LSLLEIRISS PRMTR.....
 YfvLIGRR. VSPGN.GMN IKETACLKA V.HNHS.....
 MnvLIGRR. ISPGA.GMN VDTACLKS YAGHM.....
 Dengu JevLIGRR. ISPGA.GMN VDTACLKA YAGHM.....
 Hcv D..SSGE.....RGTIATKA VAP.....S FLHWS.....MPLIR
 Bdv CDVVEGHAT DASTEL.SG YCVALR.RL QYPTLS.....TE
 TcvGAPYLAE TALKFLYSD NGTNSIE.E YLKLV.....TE
 PpvGAPYIAZ TALKFLYSD EASIEI.R YLKLV.....TE
 Cpvv YLNRDRETS RV.RDFYKA PLIAT..CO FSTVA.....TE
 Cmv YMI.SPREAT EF.VRRVLKRV VSMIT..SGD LPTLA.....
 TmvGLAPYDZ VARRLTYSD IATONELTYD YRGLA.....
 TcvGM.YM VSKRLESV SDRV.....YDSV.....
 BnyvvPKDPA YKLVF.LEC NASLSR.....NVDD.....
 TmvKTAPPGFV VY..KSLVYLV SDRVL.....FRSLF.....
 Hbv
 BsvASYS.....AISALV.SI.CY.HIDFVK FKLLF.....
 AlavRPSBYL EAALE.....SLSKI.....FAGKT.....
 Bmv YKSEFWE EYVAAAL.SSLSIE.....SLS.....FLETS.....DCVCE
 Cucv YKK.SGM..& AAL.VGAFK KYTA...N FNATL.....YTSDD
 Slvv Y.EVDN.....TP.VLALR TPAQ.SMRA FQAIR.....
 Sfv Y.EVGE.....KS.LIANT TLAR..DIRA FQAIR.....RTD
 Cnv Y.EVGC..TA.VYGA..TP.SGEM FKRLR.....DEIMAF
 Rcv Y.EVNGT.....GN.IVRAMA TLAK..SIKN FKRLR.....
 RotOISALTM LQKP.....VT FRSKTIYHO IL.....
 RcoMADR.....RC FRLMLDQY YC.....
 Ph16NIREVIAH CVSVEKT.....ER FLASVPR.....
 IbdvHILKTYR ENLAEL.....KK PVPKPPHVN.....RPVHG
 BcvNHYTS.....RQ.....RQ.....RQ.....DEIMAF
 ScvllNIEFQO.....AR YAMQA.....
 ScvlaNLMVSKV INF.....AR ANVLA.....
 PolloTIEDPO DIVRSICLMA WSKCEYVGS FLAFV.....
 EncYA.FCTLS EKLSITHLA VHSQKEDYN LFAPF.....REV.....
 TmvCK.PGTLK EKLSIALLA WISQOYDVE IFLFP.....RNV.....
 Hsv14TIDPQO DIVRSICLMA WSKCEYVGS FLAFV.....RTD
 FadvAR.RCTIQ EKLSIVAGLA WISQOPEYAR LFEPF.....OGLFEI
 CoavTODPKHTO DIVRSICLMA WNGEYEEZ FIKRI.....RSVPVG
 HavORNAKEE OMEKMGQFA FHIYEYFQV FYTFV.....GSKLR
 OqtaPR.NF ORNTIP..DC YC.DCAL.....VGE
 SpPR.NF RNRRIIP..DC YC.DCAL.....VGL
 Hs2PS.NF FCGTDLAADI YVSPPTAVS VYTKTPYGLR.L.ADRTSR..FG
 GaPF.NF HGGCNDLDDT YLVSRR.....

501
 CamvD RAKRYS.AV
 BlyvGQRHYET.....
 FlvNAMVLI ARLIATISS
 Bnyv
 Cnv FDSMLALED ARMLHML TCDEQVALED RLDR.MENDL
 Cvr
 Hcmv HRAVCGECLS LT...GCL. PVK.CEY.T ALVKH.....
 PvkP RL.RNF.....
 Pvk SLH.HLFTT HLYVH.SG.FEYF.....
 YfvLMLYTR RDRMLSLAV
 MnvLMLYTR RDLRIMANAC
 Dengu Bdv GVMRQRASR KXPPLT.C
 JevLMLYTR RDLRIMANAI
 Hcv RICEILLVSTE LQVAPKSTT
 Bdv GVMRQRASR KXPPLT.C
 Tav LIDYDITL ENLV.FD.....
 PpvY DNM.DGDS
 TdvvFCEAF..HSA.GC.....
 CpvvQICEY ETOR.CO.....
 TmvMNEFLA ETVR.FO.....
 TcvHALC ADMK.HIK.....
 BnyvvVDR.HDAI
 TmvIDGSS
 Hbv
 Bsv HCEGF FVDKIRKOF
 AlavLCKECL FMEK.HESV
 Bsv GVRVQNSD PVCK.FYRPT
 Cucv OGVVNTFCI SEFVIRVY
 SlvvGKIR.HLCC
 SfvGPVI.HLYCG
 CnvGPIV.TYGG
 RcvGPV.HLYCG
 RotRDIKPTFVN
 Rco PKES.GRANR RSVREPTCA
 Ph16
 Ibdv GLKAV.SNAL KTRV.YRZA
 Bdv IRIRV..HDI..FPK.NET
 ScvllADSS DTR..ALM
 ScvlaKSC DPTK.MAVL
 Pollo RALCLPSTY LTRM.MDSF
 Enc GVVYDFES VEVV.MSLF
 Tmv GIVVPTYS HLYR.MSLF
 Hsv14 KCLIPETYS LRRM.MDLF
 FadvPSTIS LYL.MWAV
 Coav RCLTLPAPT LGRM.MDSF
 HavEMIEYR.KSYDMRHRF
 Oqta VL..INP ASQVIRVY
 SpTRFF VIVONYSALY
 Hs2 FR.....LARI AERKRFSEK
 Ga VS.....LVRI ARVSGFWIA

Anexo 2. Alineamiento de virus de RNA cadena positiva y RNA de doble cadena reportado por Bruenn, en 1991. Los números que se encuentran abajo de las secuencias indican los ocho motivos característicos de RDPRs. Los asteriscos indican residuos altamente conservados. Los motivos se encuentran en las siguientes posiciones: 1° 1-9, 2° 98-111, 3° 160-168, 4° 281, 5° 303-305, 6° 381-383, 7° 481-484, y 8° 514-516.