



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

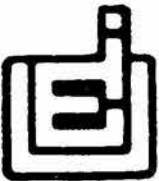
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
CAMPUS IZTACALA

EFFECTO DE MUTACIONES PUNTUALES EN LA REGION  
NO TRADUCIDA 5' (RNT 5') DE POLIOVIRUS EN  
LA REPLICACION VIRAL

BO1146/95  
Ej. 2

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G A  
P R E S E N T A  
MONICA A. DENOVA OCAMPO





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

400282



61060

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE VIROLOGIA DEL  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL DEL CENTRO DE  
INVESTIGACIONES Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN BAJO LA DIRECCION DE  
LA DRA. ROSA MA. DEL ANGEL NUÑEZ DE CACERES.**

## DEDICATORIA.

A Tí Madre, porque tu ejemplo y esfuerzó por darme lo mejor, fueron la fuerza y motor que me llevó a ser lo que soy ahora. UNA MUJER.

A mis papas-abuelos (Esperanza y Jesús) porque su ejemplo y confianza han sido y serán la mejor herencia y regalo que la vida pudo darme.

A mi hermana Georgina, por ser la mejor hermana e inmejorable amiga.

A mis Amigas (ellas saben quienes son) por estar en los tiempos buenos y en los tiempos malos, incondicionalmente conmigo, impulsandome y escuchandome siempre.

A toda mi Familia, por creer en mi y por saber esperar este momento.

Y por supuesto a la Vida, por darme todo lo indispensable para sentirme una mujer feliz, plena y satisfecha con lo logrado hasta ahora.

Solo el que alcanza su meta,  
conoce la íntima satisfacción de  
mirar hacia adelante.

A.Bierge.



## AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Rosa Ma. del Angel Núñez de Cáceres, por darme la valiosa oportunidad de ver realizado uno de mis más grandes sueños.

A todos mis compañeros del Lab. 8 de Virología del Depto. de Patología Experimental. Fernando, Salvador, Yazí, Lorena, Gaby, Martha Dueñas, Juan, José de Jesús, Carlos, Blanca.

A todos aquellos que de una u otra forma se involucraron en este trabajo. Todos mis amigos de la ENEP-Iztacala (Ellos saben quienes son).

A tí Andrés, porque eres el responsable directo de que haya conocido el mundo fascinante de la Biología Molecular y todo lo maravilloso que esta encierra, conviertendola en una de mis más grandes pasiones.

A Tí, porque aunque ya no estes ahora conmigo, formaste parte importante de mi vida y seguiras formando parte de ella hasta el final de esta; y porque me hubiera gustado mucho que compartieramos juntos este momento, como muchos otros que compartimos. Por todo lo que significas en mi vida y por todo lo que me diste  
" MIL GRACIAS".

Si deseas que tus sueños se hagan realidad. ¡ DESPIERTA !

### ABREVIATURAS.

<b>RNA</b>	Acido Ribonucleico.
<b>DNA</b>	Acido desoxiribonucleico.
<b>nm</b>	Nanómetros.
<b>Da</b>	Daltones.
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Acido Ribonucleico mensajero.
<b>tRNA</b>	Acido Robonucleico de transferencia.
<b>IRES</b>	"Internal Ribosome Entry Site". Sitio de unión interna del ribosoma.
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto.
<b>μg</b>	Microgramos.
<b>ng</b>	Nanogramos.
<b>μl</b>	Microlitros.
<b>mM</b>	Milimolar.
<b>cpm</b>	Cuentas por minuto.
<b>DEP</b>	Dietil- pirocarbonato.
<b>NTP</b>	Nucleótidos Trifosfato.
<b>DTT</b>	Ditiotreitol.
<b>ATP</b>	Adenosinatrifosfato.
<b>GTP</b>	Guanosinatrifosfato.
<b>CTP</b>	Citidinatrifosfato.
<b>UTP</b>	Uridinatrifosfato.
<b>PEG</b>	Polietilenglicol.
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sodio.
<b>TCA</b>	Acido Tricloroacético.
<b>TEMED</b>	N',N',N',N'-tetrametil etilen diamino.
<b>EDTA</b>	Acido etilendiamino tetracético.
<b>μCi</b>	Microcurie.
<b>mmol</b>	Milimol.
<b>dATP</b>	Desoxiadenosinatrifosfato.
<b>pfu</b>	Unidades formadoras de placas.
<b>CAM</b>	Cloramfenicol.

## INDICE.

	Pag.
INDICE DE FIGURAS.	1
<b>INTRODUCCION.</b>	3
* GENERALIDADES.	3
* GENERALIDADES DE POLIOVIRUS.	7
* CARACTERISTICAS DEL VIRION.	9
* INFECCION VIRAL.	11
* REPLICACION VIRAL.	14
* TRADUCCION VIRAL.	17
<b>ANTECEDENTES</b>	
* REGION NO TRADUCIDA 5'	20
* IMPORTANCIA DE LA RNT 5' DE POLIOVIRUS.	24
* ATENUACION Y VIRULENCIA.	28
* TRADUCCION CAP- INDEPENDIENTE.	33
<b>OBJETIVOS.</b>	38
<b>MATERIAL Y METODOS.</b>	
<b>MATERIAL BIOLÓGICO:</b>	39
* CELULAS.	39
* BACTERIAS.	39
* VIRUS.	39
* SUEROS UTILIZADOS.	39
* MEDIOS DE CULTIVO PARA CELULAS.	39
<b>SOLUCIONES:</b>	
* MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS.	39
* PURIFICACION M13.	41
* MUTAGENESIS DIRIGIDA.	42
- Fosforilación oligonucleótidos.	42
- Hibridación oligos-M13.	42
- Síntesis cadena complementaria.	42
* TRANSFORMACION BACTERIANA.	
- Solución $\beta$ -mercaptoetanol 250 mM.	42
* EXTRACCION FENOLICA.	43

- Fenol Saturado Tris-HCl pH 7.5	43
- Cloroformo- alcohol isoamílico 24:1	43
* GELES DE AGAROSA.	43
- Amortiguador TBE 10X	43
* GELES DE SECUENCIACION.	
- Acrilamida- Bis acrilamida 40%, 19:1.	43
- Mezcla Poliacrilamida-Urea.	44
- Solución para polimerizar.	44
- Amortiguador de corrida.	44
- Solución fijadora de geles.	44
* GELES DE SDS - POLIACRILAMIDA 10%	44
* SOLUCIONES PARA CINETICAS DE TRADUCCION-REPLICACION.	46
* SOLUCIONES PARA PLAQUEO VIRAL.	47
* SOLUCION PARA RNA.	48
* SOLUCION PARA TRANSCRIPCION " IN VITRO. "	48
* SOLUCIONES PARA SLOT-BLOT.	48
* ISOTOPOS UTILIZADOS.	49
* ENZIMAS DE RESTRICCION Y MODIFICACION UTILIZADAS.	49
<b>METODOS.</b>	
* PURIFICACION DE M13.	50
* FOSFORILACION DE OLIGONUCLEOTIDOS.	51
* HIBRIDACION DE OLIGOS-M13.	51
* SINTESIS DE CADENA COMPLEMENTARIA.	51
* SINTESIS DE cDNA Y AMPLIFICACION POR PCR.	52
* EXTRACCION DE FAGOS PARA SECUENCIAR.	53
* SECUENCIACION DE FAGOS CANDIDATOS.	54
* GELES POLIACRILAMIDA-UREA.	54
* MARCAJE DE PROTEINAS VIRALES CON Met S <sup>35</sup> .	55
* GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS.	56
* CINETICA DE REPLICACION VIRAL.	56
* PLAQUEO VIRAL.	57
* SINTESIS DE RIBOSONDAS.	58
* TRANSCRIPCION " In Vitro ".	58
* SLOT-BLOT DE RNA VIRAL.	59
<b>RESULTADOS.</b>	61
* PRODUCCION VIRAL EN CELULAS HeLa Y SK-N-SH.	65

* REPLICACION VIRAL EN CELULAS HeLa Y SK-N-SH.	68
* SINTESIS DE PROTEINAS VIRALES EN HeLa Y SK-N-SH.	71
* OBTENCION DE VIRUS MUTANTES POR MUTAGENESIS DIRIGIDA.	76
<b>DISCUSION.</b>	82
<b>CONCLUSIONES.</b>	86
<b>BIBLIOGRAFIA.</b>	87

INDICE DE FIGURAS.

Figura No.	TITULO.	
1	Esquema de familias virales que infectan vertebrados. _____	6
2	Estructura de las partículas virales. _____	10
3	Estructura genómica de Poliovirus. _____	12
4	Representación del ciclo replicativo de Poliovirus. _____	15
5	Procesamiento de la poliproteína de Poliovirus. _____	18
6	Representación esquemática de la RNT 5' de Poliovirus. _____	26
7	Dominio VI de la RNT 5' de Poliovirus tipo 3. __	32
8	Plaqueo viral en células HeLa y SK-N-SH con los virus PRV 6.1, PRV 7.3, V957, SFP8, SFP7. _____	63
9	Curva de crecimiento de virus en células HeLa infectadas a dos diferentes temperaturas. _____	66
10	Curva de crecimiento de virus en células SK-N-SH. 67	
11	Síntesis de RNA viral en células HeLa infectadas a 38.5°C y 32°C con los virus PRV 6.1, PRV 7.3, V957, SFP8, SFP7. _____	69

12	Síntesis de RNA viral en células SK-N-SH infectadas con las cepas PRV 6.1, PRV 7.3, V957, SFP8, SFP7_	70
13	Autorradiografía de la síntesis de proteínas en HeLa infectadas con los virus PRV 6.1 y SFP8.	72
14	Autorradiografía de la síntesis de proteínas en células SK-N-SH infectadas con los virus PRV 6.1 y SFP8.	73
15	Autorradiografía de la síntesis de proteína en células HeLa infectadas con PRV 6.1 y V957.	74
16	Autorradiografía de la síntesis de proteína viral en células SK-N-SH de PRV 6.1 y V957.	75
17	Autorradiografía de la síntesis de proteína en células HeLa infectadas con PRV 6.1 y SFP7.	77
18	Autorradiografía de la síntesis de proteína en células SK-N-SH infectadas con PRV 6.1 y SFP7_	78
19	Secuenciación del cDNA de la RNT 5' de poliovirus tipo 3 ( Cepa León ).	79
20	Productos de PCR obtenidos de la RNT 5' de la cepa León.	81

## RESUMEN

El virus de la poliomielitis (poliovirus) ha sido usado como modelo para el estudio del mecanismo de traducción alternativo, conocido como traducción independiente de cap. El RNAm de poliovirus posee ciertas características estructurales que lo hacen diferente a la mayoría de las RNAm celulares como: a) una región no traducida 5' (RNT 5') larga y de estructura secundaria compleja y b) la ausencia de la estructura "cap" en el extremo 5'. La RNT 5' regula la traducción y replicación viral y está involucrada en modular la atenuación y virulencia de las cepas. En este trabajo, analizamos la replicación y traducción de 5 cepas virales con cambios puntuales en la RNT 5', en dos líneas celulares diferentes HeLa y SK-N-SH. Las cepas con cambios puntuales en las bases 472 y 482 (SFP8 y SFP7) que desestabilizan la estructura secundaria del dominio VI de la RNT 5' y cuyo fenotipo es atenuado fueron deficientes en replicación y traducción tanto en células HeLa como células nerviosas (SK-N-SH).

La revertante de la cepa SFP8 llamada V957 cuyos cambios en las bases 482 y 529, restablecen la estructura secundaria del dominio VI mostró una eficiente replicación y traducción en ambas líneas celulares. Estos datos enfatizan que el restablecimiento de la estructura secundaria conlleva a la recuperación de la traducción y replicación viral. La secuencia al igual que la estructura secundaria que adopta la RNT 5' en el RNAm viral, así como su interacción con los factores celulares son determinantes para la adecuada traducción independiente de cap.



## INTRODUCCION.

### GENERALIDADES:

Los virus juegan un papel central en el análisis de los principios generales de la Biología Moderna. Debido a su simplicidad, se han utilizado como un sistema genético que ha permitido conocer la estructura y función de genes eucarióticos.

Por lo anterior, la Virología se ha constituido como un nuevo campo de investigación cuyos inicios se remontan al siglo XIX, con los trabajos realizados por Pasteur en 1881. Hacia 1949 Enders y cols., observaron el crecimiento de poliovirus en cultivos celulares, iniciandose así una nueva era de la Virología.

Posteriormente se han realizado un gran número de estudios encaminados al aislamiento de muchos virus involucrados en enfermedades de importancia para el hombre, animales y plantas (Fields, 1990).

A partir de la década de los 60's, el principal interés de la genética fue el estudio de los mecanismos por los cuales se regulan las funciones celulares, así como la maquinaria fundamental de la célula. Una serie de investigaciones abordaron estudios tendientes a conocer los mecanismos que regulan la expresión del genoma, a partir de los cuales se hicieron los principales avances sobre las funciones celulares durante los pasados 50 años desde el punto de

vista " Molecular" y se han debido al estudio de virus y de sistemas Virus-Célula. Los primeros estudios fueron realizados por Delbruck, Luria, y Hershey con virus bacterianos, revelaron con gran detalle el control de la transcripción de la información genética (Goodheart, 1969; Tapia, 1990).

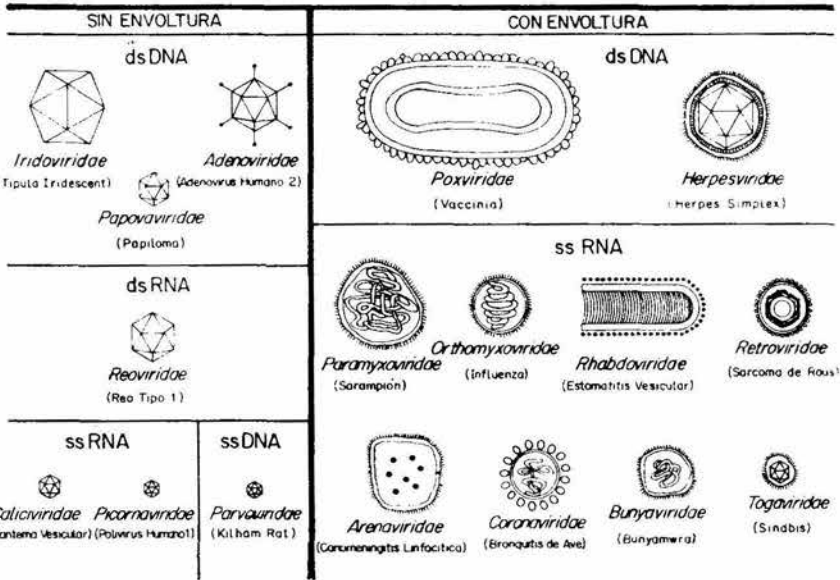
Por otra parte, los virus de animales han sido usados como una herramienta importante para elucidar los mecanismos regulatorios involucrados en la traducción, transcripción y replicación en células eucariotas, ejemplo de esto son los virus que infectan células de mamífero. Entre los avances más importantes que podemos mencionar, estan los estudios de replicación del DNA utilizando al virus SV 40 y poliomavirus como análogo de cromatina celular; el procesamiento del RNA "splicing" utilizando a adenovirus como modelo de estudio; experimentos sobre regulación de la transcripción usando DNA's virales como molde ó bien como vehículos de clonación. En resumen, los virus han jugado un papel muy importante dentro de la Biología Molecular, además de ser utilizados como vehículos de clonación y expresión en experimentos importantes de la regulación celular (Tapia, 1990).

Actualmente la Virología se ha enfocado además del aislamiento, propagación y caracterización antigénica de un virus, a entender a nivel molecular; la naturaleza del virus, la interacción virus - huésped, las bases moleculares de la atenuación, y todos los mecanismos que intervienen en la patogenía del virus, ya que solo de ésta manera se lograrán diseñar métodos de diagnóstico, control y erradicación de enfermedades virales.

Los virus son una clase única de agentes infecciosos que se distinguen por ser pequeños parásitos intracelulares obligados (Davis y cols., 1983), cuyo genoma consiste de un solo tipo de ácido nucleíco, DNA ó RNA, el cual se reproduce dentro de las células vivas, utilizando su maquinaria sintética para dirigir la síntesis de partículas especializadas, "los viriones", que contienen el genoma viral y lo transfieren a otras células (Luria y cols., 1978) (Fig.1).

Hasta la fecha se han identificado cientos de virus inmunológicamente diferentes que producen enfermedades de diversa índole: Dengue, Fiebre amarilla, Sarampión, Rubeola, Hepatitis, Influenza, Resfriado común, SIDA, Poliomiелitis, Paperas, etc; por mencionar solo algunos (Pizarro-Suarez, 1971) los cuales estan ampliamente distribuidos en todas las regiones de la tierra, y que plantean problemas que difieren completamente de los que se presentan cuando se trabaja con otro tipo de microorganismos (Tapia, 1990). Por otra parte, si bien es cierto que la producción de virus animales y bacterianos involucra los mismos eventos: replicación, transcripción y traducción, los mecanismos de expresión difieren en varios aspectos, como: la naturaleza del ácido nucleíco del que esta constituido el virus, el mecanismo de replicación, la vía de entrada, la polaridad del material genético, el tipo de huésped y su respuesta, las enzimas involucradas en su multiplicación, etc. Estas características han permitido generar múltiples grupos de clasificación taxonómicas (Baltimore, 1971; Bachrach 1978; Matthews, 1982), en donde, los virus son agrupados en

## FAMILIAS DE VIRUS QUE INFECTAN VERTEBRADOS



**Figura 1.- ESQUEMA DE FAMILIAS VIRALES QUE INFECTAN VERTEBRADOS.**

Aquí se incluyen todos los virus de vertebrados tanto de DNA cadena sencilla y doble con envoltura y sin ella, así como aquellos virus de RNA también de cadena doble ó sencilla, envueltos y no envueltos, dentro de los cuales se ubica la familia Picornaviridae a la cual pertenece Poliovirus.

clases, dependiendo del método de transmitir la información genética de una generación a la siguiente (Matthews, 1982) (Fig. 1).

#### **GENERALIDADES DE POLIOVIRUS:**

De acuerdo a la clasificación propuesta por Matthews, el virus de la Poliomiелitis pertenece a la familia Picornaviridae (pico pequeño, RNA ácido ribonucleico), la cual se caracteriza porque sus miembros son pequeños (20-30 nm), de forma icosaédrica, desnudos, con un genoma de RNA de cadena sencilla, polaridad positiva, (Rueckert, 1985; Koch and Koch, 1985). La familia incluye 5 géneros: Enterovirus (poliovirus, coxsackievirus, echovirus, y otros) Rinovirus, Cardiovirus, Aftovirus y Hepatovirus (Cooper, et.al, 1978; Matthews, 1982). Los Picornavirus constituyen el grupo más importante de agentes patógenos para el hombre; ya que existen alrededor de 72 tipos de enterovirus y más de 100 serotipos de rinovirus que lo afectan directamente (Matthews, 1982;

Tapia, 1990), es por ello que su estudio se ha convertido en uno de los principales temas de trabajo para muchos Biólogos Moleculares.

Este grupo de virus animales por ser los más pequeños y simples conocidos, además de la simplicidad con que se propagan y purifican, poseen virtudes técnicas que los hacen un modelo ideal para detallar la investigación molecular. Durante los pasados 15 años estas características han permitido usarlos para estudiar los mecanismos de la expresión genética tanto celular como viral

(Rekosh, 1977).

Las investigaciones han permitido determinar que las infecciones por Picornavirus causan dramáticos cambios en el metabolismo macromolecular (Fields, 1990), pues la proporción de RNA sintetizado declina rápidamente después de la infección, acompañado por la síntesis vigorosa del RNA viral en el citoplasma (Fields, 1990).

Poliovirus es el prototipo de esta familia y muchos descubrimientos claves han emergido de investigaciones realizadas con él, su importancia radica en la devastante y, en ocasiones, letal enfermedad que provoca en sus víctimas (Fenner y cols., 1972; Melnick, 1976). La poliomielitis (parálisis infantil) es una enfermedad febril aguda, que se manifiesta en general por debilidad y parálisis de las extremidades. Las alteraciones más importantes se presentan en la médula espinal que muestra gran congestión vascular, especialmente en las astas anteriores (Hashimoto, et.al, 1984; Del Angel, 1990).

La penetración del virus al organismo se lleva a cabo por vía oral, llegando al tracto intestinal en donde causa lesiones ligeras. La diseminación al resto del organismo ocurre por vía sanguínea ó neuronal, por las cuales llega al sistema nervioso central, estableciéndose en los nervios periféricos causando la muerte celular, que explica el síndrome clínico de la parálisis y, en contados casos, la muerte del individuo (Racaniello, 1988).

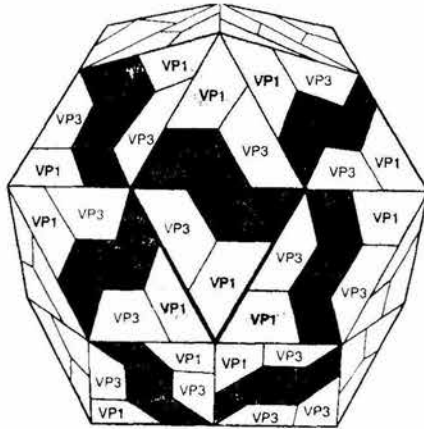
## CARACTERISTICAS DEL VIRION:

El virión de poliovirus es pequeño, con diámetro aproximado de 20-30 nm, forma icosaédrica y sin envoltura. La cubierta protéica del virus se compone de 60 copias de cada proteína estructural: VP1, VP2, VP3, y VP4 con pesos moleculares de 34, 30, 26 y 7 KDa respectivamente (Fig. 2).

Su genoma consiste de una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva (RNA<sup>+</sup>) correspondiente a 30% de su peso. Esta cadena de RNA tiene un peso de  $2.41 \times 10^6$  Da. y un coeficiente de sedimentación de 35S (Babich, et.al,1980; Golin, et.al, 1980; Hewlett, M. 1980; Kitamura, et.al, 1981; Wimmer, E. 1982; Cajero, M. 1991) con 7433 nucleótidos y una composición de bases de A: 30.2%, G: 22.8%, C: 23.1% y U: 23.9% (Kitamura y cols. 1981; Candelario, 1986).

El RNA viral puede dividirse en una región no traducida 5' (RNT 5') de 743 nucleótidos, una zona de marco abierto de lectura y una región no traducida 3' (RNT 3') de 72 nucleótidos (Kitamura y cols. 1981; Racaniello, V. 1988; Cajero, M. 1991). El genoma y el RNA mensajero (mRNA) de poliovirus son idénticos en secuencia nucleotídica y difieren únicamente en la presencia (en el RNA genómico) ó ausencia (en el mRNA) de una proteína denominada VPg unida covalentemente al extremo 5' terminal del RNA (Lee, et.al, 1977; Flanagan, et.al, 1977; Nomoto, et. al, 1977; Del Angel, 1990).

El mRNA viral por tanto, carece de la estructura " cap "



**Figura 2.-** ESTRUCTURA ICOSAEDRICA DE LAS PARTICULAS VIRALES DE PICORNAVIRUS. Las proteínas VP1,2 y 3 están expuestas en la superficie de la partícula, la proteína VP4 se halla hacia el interior de la cápside formando la partícula viral madura. ( Tomado de Cann, 1993 ).

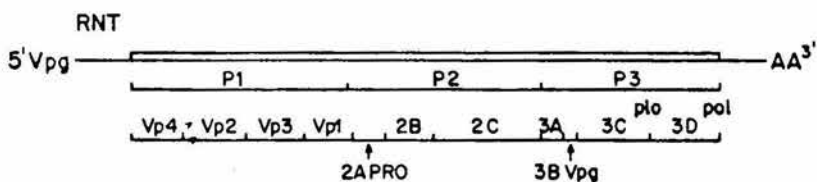


que la mayoría de los mRNA de eucariotes, el mRNA de poliovirus posee un segmento de poli-A en el extremo 3' terminal (Armstrong, et.al,1972) con una longitud promedio de 60 residuos (Spector, et. al, 1974), el cual se cree participa en la replicación viral, permitiendo la síntesis del RNA polaridad negativa (Dasgupta, et. al, 1980; Spector, et. al, 1974; Cajero, 1991).

La región del marco abierto de lectura del mRNA, codifica todas las proteínas estructurales y no estructurales maduras (Nicklin, et. al, 1986; Pallasch, et.al,1984) (**Fig. 3**). Las proteínas de cápside VP1, VP2 y VP3 están entrelazadas entre sí y expuestas al exterior; mientras que la proteína VP4 es enteramente interna; estas proteínas están ubicadas en el amino terminal de una poliproteína que es el producto de traducción del mRNA de poliovirus cuyo P.M. es de 247,000 daltones. Las proteínas que intervienen en la replicación viral se encuentran hacia el extremo 3'terminal del genoma viral (regiones P2 y P3).

#### **INFECCION VIRAL:**

El ciclo replicativo de poliovirus inicia con la unión del virus (cápside), a un receptor celular específico en la superficie de la célula huésped; con lo cual se inicia una serie de eventos complejos: adsorción, penetración y liberación del genoma en el citoplasma (Cajero, 1991; Tapia, 1990). El receptor de poliovirus es una proteína integral de membrana con aminoácidos y dominios



**Figura 3 .-** ESTRUCTURA GENOMICA DE POLIOVIRUS.

El genoma de RNA de cadena sencilla de poliovirus muestra la proteína VPg unida al extremo 5' en la RNT y las regiones P1 (estructural) P2 y P3 (no estructural) de la poliproteína (Tomado de Nicklin y cols 1986).

característicos de los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Mendelson, et. al, 1989; Del Angel, 1990). En células HeLa se ha calculado que existen aproximadamente 100,000 receptores para el virus por célula (Miller, et. al, 1974). En la estructura tridimensional de los virus pertenecientes a la familia de los picornavirus existe un foso ó cavidad que esta involucrada en la unión al receptor. Durante la adsorción, aparentemente las 4 proteínas participan (VP1,VP2,VP3 y VP4), aunque el polipéptido VP4 parece participar de manera más directa, dado que la perdida de esta proteína está asociada a una baja infectividad del virus. Una vez que el virus se ha unido al receptor se lleva a cabo la penetración mediada por endosomas (Willingmann, et. al, 1989) en donde además se realiza el desnudamiento (Luria, 1978) que permite que el RNAv, sea liberado en el citoplasma de la célula huésped (Luria, 1978).

El desnudamiento involucra el rearrreglo de dos proteínas de la cápside (VP2 y VP4), seguida de la disociación de VP1 (Rueckert, 1976; Del Angel, 1990). Una vez que se expresa el genoma viral, se producen alrededor de 15 proteínas virales entre las que se encuentran las proteínas estructurales VP0, VP1 y VP3, mismas que se agrupan formando la procápside que, a su vez, al asociarse a una molécula de RNA viral pasa a un estadio posterior de maduración, "El Provirión" (Fernández-Tomás, et.al, 1973; Del Angel,1990).

Esta ribonucleoproteína, mediante procesamiento de VP0 a VP2 y VP4, da origen a la partícula viral madura ó virión, que se encuentra formado por 60 unidades idénticas (protómeros) de las

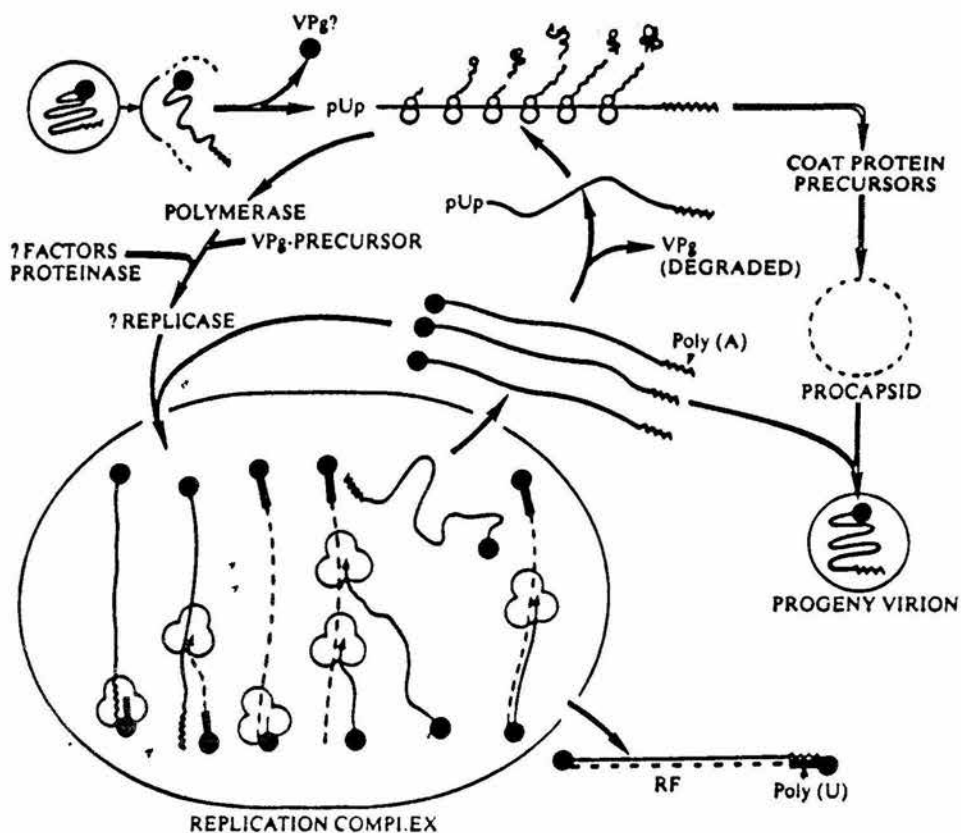
cuatro proteínas estructurales que rearrregladas de manera estable y simétrica, forman la cápside (Rueckert, 1976; Del Angel, 1990; Cajero, 1991). En el transcurso de la infección, los constituyentes virales se sintetizan y ensamblan para formar la progenie viral.

Posteriormente hay una pérdida irreversible de la capacidad celular para sintetizar cualquier macromolécula celular ó viral, finalizando el ciclo viral con la liberación de viriones maduros y la lisis celular (Luria et al, 1978; Del Angel, 1990). Se ha observado que la infección de células permisivas con el virus inhibe la replicación, la transcripción y traducción celulares; estos dos últimos procesos son inhibidos durante la infección temprana, mientras que la inhibición en la replicación del DNA es un proceso tardío, del cual se conoce poco. (Del Angel, 1990)

#### **REPLICACION VIRAL:**

Se sabe que la replicación del RNA se lleva a cabo en complejos membranosos, pero se desconoce como es que el molde del RNA y las proteínas involucradas en este proceso se secuestran en este complejo, por lo que todo el ciclo replicativo de poliovirus se lleva a cabo en el citoplasma (Detjen, et.al, 1978) independiente de la maquinaria de la célula infectada.

Mediante estudios de cinéticas de replicación y traducción con precursores radiactivos se ha podido establecer que el tiempo aproximado para la síntesis de moléculas de RNA<sub>v</sub>, es de



**Figura 4.- REPRESENTACION DEL CICLO REPLICATIVO DE POLIOVIRUS.**

El virion se une a su receptor celular y penetra hacia el interior celular por el mecanismo conocido como endocitosis mediada por receptor; el RNA viral se desnuda de la cubierta viral, para iniciar la traducción del genoma y generar las proteínas virales necesarias para generar nuevas partículas virales y sintetizar moléculas de RNA\* que se encapsidan ó sirven de templados para su traducción (Tomado de Wimmer, 1987; modificado de Kitamura, 1980).

aproximadamente 45 segundos.

El proceso de replicación viral se inicia con la síntesis de un RNA viral de polaridad negativa, el cual sirve de molde para la síntesis de moléculas de RNA de polaridad positiva, las cuales pueden traducirse ó bien servir como nuevos RNA's capaces de ser encapsidados (Almond, 1987) (Fig. 4).

Se ha visto que la replicación de poliovirus requiere de la participación de proteínas de la célula huésped así como de proteínas virales (Takeda, et.al, 1986; Cajero, 1991).

La enzima viral encargada de la síntesis del RNA es la proteína 3D ó replicasa viral; está codificada en la región P3 del genoma viral hacia el extremo 3', y depende de RNA y de un factor celular para llevar a cabo su función. El factor celular se conoce como p36; el cual esta asociado a un complejo ribonucleoproteico de replicación que se forma alrededor de los nucleótidos 1-88 del RNA de poliovirus (Andino, 1993) aunque el papel de este complejo no ha sido probado (Borman, 1994). Durante el proceso de replicación del genoma viral se han observado 3 poblaciones de RNA con diferentes coeficientes de sedimentación; un RNA de una sola cadena 35S, un RNA de doble cadena 18S conocido como intermediario replicativo que es infectivo (Levintow, 1974) y otro RNA también de doble cadena 20S conocido como forma replicativa (Levintow, 1974) el cual también es infectivo y se piensa que podría ser un intermediario replicativo que ha terminado la síntesis.

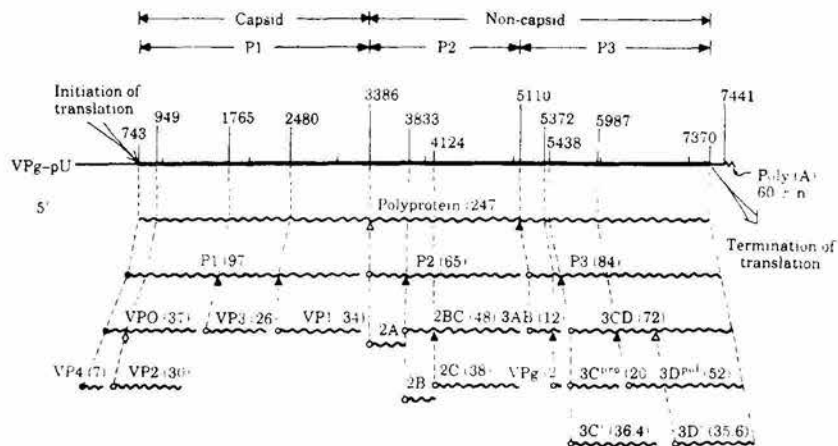
## TRADUCCION VIRAL:

Como ya se mencionó anteriormente el mRNA de poliovirus al ser traducido da como producto único una poliproteína de alto peso molecular, la cual es procesada inicialmente en 3 productos denominados P1, P2 y P3. Estos polipéptidos codifican tanto para las proteínas estructurales (P1) como para las no estructurales del virus (P2 y P3). El mRNA viral es monocistrónico y el sitio de inicio de la traducción se localiza en el nucleótido 743 y el de terminación en el nucleótido 7369 (Dorner, et.al, 1982) (Fig. 5).

El precursor primario P1 origina, por procesamiento proteolítico (proteasa 3CD) a las proteínas de cápside, VP0, VP1 y VP3. Se ha establecido que este polipéptido actúa como cofactor para la iniciación de la síntesis de RNA y que se une en presencia de un factor celular del huésped ó viral al extremo 5' del tallo-burbuja del RNA (Andino et al, 1990; Andino et al, 1990 b; Wimmer, 1993).

Además Andino y cols; sugieren que este complejo consiste de una proteína viral y celular y que juegan un papel importante en la iniciación de la síntesis de la cadena positiva del RNA que puede servir para estabilizar parcialmente el RNA de forma replicativa (Wimmer, E y Nomoto, A. 1993). VP0 al ser procesada por esta misma enzima genera a VP2 y VP4 en el estadio final durante la maduración del virus (Jole, J. 1988; Larsen, et.al, 1981, 1982 Cajero, 1991).

Por procesamiento de los polipéptidos P2 y P3 se producen dos proteínas que actúan en la replicación viral, P2C y P3D, en la primera, se haya el locus de resistencia a guanidina que es un



**Figura 5.- PROCESAMIENTO DE LA POLIPROTEINA DE POLIOVIRUS.**

En el esquema se indican las Regiones No Traducidas 5' y 3' del RNA viral y los sitios de inicio y terminación de la traducción, representadas en la línea continua. Las líneas onduladas corresponden a los productos del procesamiento proteolítico que sufre la poliproteína, indicándose los nombres de dichos productos y los números en paréntesis corresponden a los pesos moleculares calculados por secuencia de aminoácidos (Tomado de Wimmer y Nomoto, 1993, modificado de Kitamura, N. 1981)



inhibidor de la replicación viral (Pincus, et.al, 1986; Anderson-Sillman, et.al, 1984; Del Angel, 1990) mientras que la proteína P3D, conocida como la replicasa viral, es la responsable directa de la síntesis del RNA viral (Flanegan, et.al, 1979). Otra proteína de la región P2 es 2A la cual es también responsable del procesamiento de la poliproteína y de la inhibición de la síntesis de proteínas de la célula huésped, además de ser un activador traduccional (Hellen, 1992; Lee, 1988; Sonenberg, 1987; Molla, 1993; Hambidge, 1992; Wimmer, 1993). Se ha visto que tanto 3C<sup>Pro</sup> y 2A<sup>Pro</sup> modifican ó inactivan un factor de transcripción dependiente de polimerasa III (TFIIIC) y a la proteína celular que se une a la caja TATA (TFIIB) por lo cual estas dos proteínas virales irreversiblemente inhiben la traducción y transcripción celular; siendo una de las principales estrategias por las que poliovirus mata a la célula huésped en infecciones líticas (Wimmer, 1993).

En el precursor P3 se encuentran codificadas las proteínas VPg, P3B, P3C y P3D; la función de P3B se desconoce hasta ahora (Emini, et.al, 1982; Nicklin, et.al, 1986; Pallasch, et.al, 1984; Cajero, 1991), mientras que VPg es una proteína que se une covalentemente al extremo 5' y que esta ausente en el mRNA viral como ya se mencionó con anterioridad (Crawford, et.al, 1983; Del Angel, 1990).

Algunos precursores de la poliproteína pueden ser usados en funciones específicas en la replicación viral, distintas de la función que realizan cuando son procesados (Wimmer, 1993) (Fig. 5).

Ahora bien, como poliovirus necesita de su replicasa para poder llevar a cabo la síntesis de partículas virales; el primer

paso después de la infección por poliovirus es la traducción de su mRNA, evento fundamental en el proceso infeccioso, ya que de él depende la multiplicación viral. Como se mencionó anteriormente, el mRNA de poliovirus carece de la estructura "cap" en el extremo 5', por lo que su traducción es diferente de la llevada a cabo con los RNA's mensajeros celulares. A pesar de que no se conoce el mecanismo exacto que sigue el virus de la poliomielitis para traducirse, se sabe que la RNT 5' juega un papel muy importante.

#### **ANTECEDENTES**

##### **REGION NO TRADUCIDA 5' (RNT 5'):**

Recientemente se ha puesto de manifiesto que la región no traducida 5' de poliovirus (RNT 5') juega un papel importante en la expresión del virus. Las funciones, se han elucidado a través de experimentos de recombinación genética, construcción de virus quiméricos, mutagenesis dirigida, deleciones e inserciones y estudios computacionales. Como su nombre lo indica se encuentra localizada en el extremo 5' del mRNA viral y esta formada por 743 bases (Dorner, et.al, 1982). La RNT 5' contiene 7 codones potenciales de iniciación, de los cuales 3 conservan la misma posición en los tres serotipos de poliovirus (Kitamura, et.al, 1981; Racaniello, et.al, 1981; Toyoda, et.al, 1984) y otros

miembros del género.

La modificación de los primeros 6 codones se ha visto que no produce un cambio en el fenotipo del virus resultante, sin embargo la modificación localizada en el séptimo codón localizado justo antes del triplete AUG usado para el inicio de la traducción viral, reduce la capacidad traduccional del virus obtenido (Pelletier, 1988). Esta evidencia sugiere una cierta funcionalidad, al menos de este codón, como una señal control de la traducción (Agol, 1991).

La RNT 5' es la más conservada del genoma entre los Enterovirus y entre los enterovirus y rinovirus; su estructura primaria esta conservada en los primeros 650 nucleótidos (Pöyry, 1992; Toyoda, 1984; Wimmer, 1993); pequeñas mutaciones en esta región influyen tanto en el fenotipo atenuado ó virulento y su traducción independiente de cap, sugieren que la estructura secundaria podría ser importante para su función (Evans, 1985; Trono, 1988; Wimmer, 1993).

Hay evidencias de que en poliovirus y otros miembros de los picornavirus la RNT 5' posee una extensa estructura secundaria. Se considera que la estructura secundaria más que la estructura primaria es importante para la replicación eficiente del genoma (Andino comunicación personal; Agol, 1991) pues una delección de 4 pb da como resultado una viabilidad viral disminuida (Kuge y Nomoto, 1987; Agol, 1991) mientras que la inserción de 4 pb en esta misma región, produce una mutante con fenotipo termosensible y de placa pequeña, así como una severa lesión en la síntesis de RNA viral (Trono et.al, 1988a; Agol, 1991).

En cuanto a la replicación relacionada con la RNT 5' se ha encontrado que una mutación puntual en la posición 472 de poliovirus tipo 3 y en la 480 de poliovirus tipo 1, puede afectar dramáticamente la replicación en cultivos celulares (Cajero, 1991); además se sabe que la información contenida en la secuencia ubicada entre la posición 551-563 juega un papel esencial en la replicación viral y que la secuencia comprendida entre las bases 561-599 mantienen la eficiencia en ciertos pasos de la replicación viral.

Así mismo se ha postulado que la proteína 3C interactúa con la horquilla de la RNT 5' de poliovirus (posición 2-9/82-88) y que esta interacción está involucrada en la replicación del genoma viral (Andino et.al, 1990; Agol, 1991).

La necesidad de secuencias y factores sugiere una posible interacción RNA-proteína como primer paso en la traducción viral.

En experimentos realizados por Nicklin y cols. (1987), se ha encontrado que la RNT 5' no es esencial para la traducción "in vitro", sin embargo, si lo es para la traducción que se lleva a cabo "in vivo" y la delección de los primeros 115 nucleótidos de la RNT no produce virus infectivos después de la transfección del RNA viral (Johnson y Semler, 1988; Racaniello y Baltimore, 1981b; Tapia, 1990).

Además se ha visto que la eliminación de aproximadamente 140 nucleótidos de la RNT 5' en algunas ocasiones decrementa la actividad de esta región (Pelletier et.al, 1988b; Pelletier y Sonenberg, 1988; Agol, 1991).

La manipulación genética de esta RNT 5' ha permitido la obtención de virus mutantes que expresan fenotipos iguales al silvestre, mutantes que presentan deficiencias en replicación y/o traducción viral y algunas otras que resultan ser letales (Kuge et.al, 1987; La Monica et.al, 1986; Omata et.al, 1986; Racaniello et.al, 1986; Svitkin, 1985). Los mutantes que resultan ser deficientes en traducción y replicación son atenuados, lo cual sugiere que el proceso de traducción viral y neurovirulencia están correlacionados ya que a menor eficiencia de traducción viral, se requiere de más tiempo para la replicación y esto da oportunidad al huésped a generar Ab contra el virus y desde luego disminuir el efecto virulento (Del Angel, 1990).

También se ha observado que las variantes ó cambios que modifican severamente la viabilidad del virus, se localizan en regiones con una estructura secundaria compleja; y que, como se mencionó, anteriormente se encuentra muy conservada en varios picornavirus, lo cual es indicativo de que la estructura de la RNT 5' juega un papel importante en el proceso replicativo del virus.

Otros posibles papeles de la RNT 5' podrían ser en la unión de la RNA-polimerasa viral al extremo 3' de la cadena positiva y/o tal vez en el empaquetamiento y ensamble del RNA de cadena positiva en los viriones, así como en la unión presumible de moléculas regulatorias que controlan la replicación y traducción del RNA viral (Trono et.al, 1988; Andino, R. 1990; Cajero, 1991).

Lo conservado de la secuencia y las propiedades regulatorias de la RNT, ofrece el potencial de ensayar nuevas vacunas vivas

atenuadas, construidas por ingeniería genética incapaces de revertir a la neurovirulencia (Pelletier, 1988; Racaniello, 1988), así como la posibilidad de estudiar el curso que sigue una infección viral y la patogenicidad molecular, que puedan permitir evaluar el porcentaje de reversión al fenotipo virulento "in vitro" e "in vivo", empleando una combinación de la técnica de PCR y endonucleasas de restricción, etc. (Cajero, 1992).

#### **IMPORTANCIA DE LA RNT 5' DE POLIOVIRUS:**

Los estudios realizados por diversos grupos con la RNT 5' sugieren una relación cercana entre secuencia y estructura secundaria; eficiencia de traducción y neurovirulencia. Sin embargo hasta el momento no es claro como una modificación en secuencia es capaz de generar una serie de cambios en el virus reduciendo su capacidad traduccional y su virulencia (Del Angel, 1990).

Es importante considerar que además de ser la RNT una región que evolutivamente se encuentra muy conservada, la estructura secundaria que posee puede jugar un papel en el mecanismo de traducción independiente de "cap".

En base a todo esto se proponen 7 dominios involucrados en el control de la traducción (Fig. 6). Los 2 primeros dominios que van de los nucleótidos 10-34 y 51-78 al parecer no son esenciales para la funcionalidad de la RNT 5' de poliovirus (Meerovitch y Sonenberg, 1993).

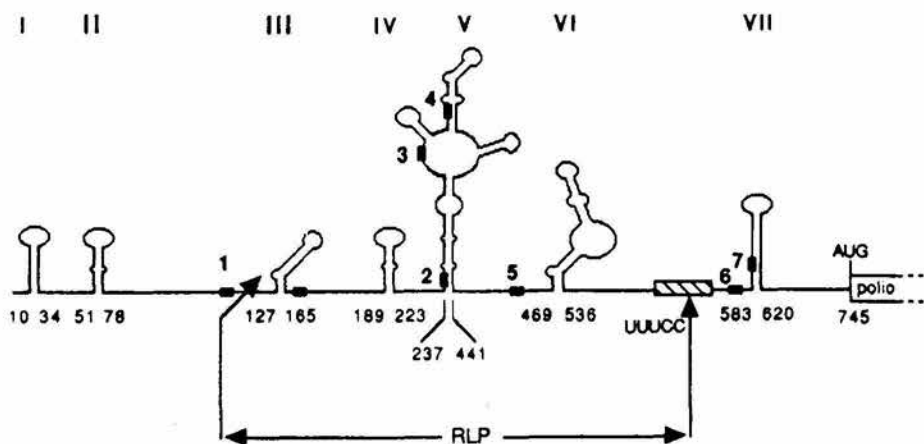
Por ensayos de delección en el sitio de unión interno de ribosomas de poliovirus realizados tanto "in vitro" como "in vivo" se ha podido delimitar la región necesaria para la traducción independiente de cap; comprende de los nucleótidos 134 a 556; sugiriéndose que gran parte de esta región es importante para la interacción directa con la maquinaria traduccional ó el mantenimiento de la estructura secundaria y terciaria de esta interacción. Mutaciones puntuales que modifican el tallo ó en la secuencia del loop del dominio III suprimen la traducción interna (Nicholson, et.al, 1991; Meerovitch, 1993) mientras que, mutaciones compensatorias restauran la traducción, lo que sugiere que la integridad de este dominio es importante para su función (Perez-Bercoff, comunicación personal; Meerovitch, 1993).

El dominio IV que va del nucleótido 189 al 223, no es esencial, ya que su delección tiene un pequeño efecto en la traducción (Nicholson, 1991; Dildine y Semler, 1988, 1991; Meerovitch, 1993).

Sin embargo, cambios en este loop podría afectar negativamente la estructura terciaria del sitio de unión interno del ribosoma.

Delecciones internas y pequeñas inserciones en el dominio V sugieren que esta región es esencial para la traducción interna (Trono, 1988; Kuge, 1987; Nicholson, 1991; Meerovitch, 1993)

(Fig. 6). Diferentes mutantes, en las que se supone una disrupción en un par de bases en el dominio VI resultaron ser virus no infectivos sugiriendo que esta estructura es requerida para la traducción eficiente (Haller, 1992; Meerovitch, 1993).



**Figura 6.- REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA RNT 5' DE POLIOVIRUS.**

En el cual se indican los 7 dominios en los que se ha dividido la RNT 5' y las posiciones de los nucleótidos de inicio y termino de cada dominio; así como la región requerida para la traducción cap-independiente (RLP) sitio de unión interna del ribosoma (Tomado de Meerovitch y Sonenberg, 1993).



Se ha sugerido que el espacio entre los dominios **IV-V** y **V-VI** juega un papel en el mantenimiento de la integridad estructural (Nicholson, 1991; Dildine, 1991; Meerovitch, 1993). La integridad del dominio **VII** no es crítica para la traducción basal (Meerovitch, 1991; Pilipenko, 1992; Haller, 1992; Meerovitch, 1993) aunque la secuencia primaria de esta estructura (dentro de la cual se halla el séptimo codón AUG de inicio de la traducción) juega un papel positivo en la modulación de la traducción eficiente de poliovirus (Meerovitch, 1991; Kuge y Nomoto, 1987; Meerovitch, 1993).

Es importante mencionar que la región que va del nucleótido 451 a la 559 comprendidos entre los dominios **V** y **VII** contienen los principales determinantes de atenuación y neurovirulencia en los 3 serotipos de poliovirus y que afectan la traducción del RNA (Svitkin, 1990; Meerovitch, 1993) (**Figs. 6 y 7**).

La región que va del nucleótido 634 al codón AUG iniciador muestra un bajo grado de homología y por tanto se cree que no tiene una estructura secundaria estable, y por lo cual se supone que el ribosoma recorre esta región para localizar el codón AUG de iniciación lo cual puede facilitar la traducción, y esto puede determinar en parte la independencia a la estructura "cap" en estos virus (Cajero, 1991). Estas funciones, probablemente, podrían estar mediadas por la interacción de polipéptidos celulares con la RNT 5' (Del Angel, 1989)

Por lo antes expuesto, el estudio de la RNT 5' del genoma de poliovirus, y su conocimiento detallado tiene una importancia trascendental, por ejemplo: los análisis de secuencia que se han

hecho y que sugieren que la mutación en la posición 472, puede producir un cambio significativo en la estructura secundaria de la RNT 5' (Almond, J. W. 1987). En poliovirus tipo 3 Sabin 3, el virus atenuado que sufre un solo cambio de U por C en el nucleótido 472 presenta un incremento en la neurovirulencia además de proporcionar la ventaja de crecer en el intestino humano (Westrop y cols, 1989).

Este cambio, al parecer, es muy drástico para la estabilidad de la estructura secundaria, y posiblemente que cambios análogos sean importantes también en la atenuación de poliovirus tipo 1 (posición 480), (según Skinner y Racaniello, 1989; Kawamura, 1989).

Gracias a numerosos trabajos con la RNT de diferentes picornavirus, se sabe que esta región no solamente está involucrada en los eventos antes mencionados, sino que también puede determinar diversos fenotipos biológicos como son: tamaño de placas virales, termosensibilidad y atenuación y virulencia, entre otros (Agol 1991; Andino, 1990; Bienkowska, 1988; Dildine, 1991; Evans, 1985; Eustafieva, 1990; Kuge, 1987; La Monica, 1987; Lipton, 1991).

#### **ATENUACION Y VIRULENCIA:**

Debido al avance de las técnicas de propagación de poliovirus en cultivos celulares, se ha podido caracterizar algunos marcadores de atenuación y neurovirulencia. Recientemente se ha investigado las bases genéticas de esos marcadores y su correlación con neurovirulencia. Con esta finalidad se han usado poliovirus recombinantes derivados de poliovirus tipo 1 virulento (Mahoney) y

la cepa vacunal Sabin tipo 1, cuya termosensibilidad está determinada por múltiples mutaciones que pueden involucrar: proteínas de la cápside, la RNA polimerasa 3D y secuencias no codificantes del extremo 3'; en el caso de la cepa vacunal Sabin 3 su atenuación parece estar relacionada a una mutación en la proteína de cápside VP3 (Fields, 1990).

La relación entre neurovirulencia y RNT 5' se ha establecido a raíz de evidencias encontradas en virus que manifiestan cambios puntuales de algunas bases en la RNT 5' y que, al parecer, son determinantes para estos procesos (Kuge et al, 1987; La Monica et al, 1988; Omata et al, 1986; Racaniello, 1986; Svitkin et al, 1985; Del Angel, 1990).

Como se mencionó anteriormente, gran variedad de evidencias sugieren que un cambio localizado en la posición 472, en la RNT 5', puede ser un determinante importante de virulencia. El virus silvestre con fenotipo virulento y revertantes vacunales virulentos tienen una Citosina en esta posición mientras que cepas atenuadas tienen un Uracilo (Fields, 1990; Minor et.al, 1993).

Recientemente se ha sugerido que la RNT 5', entre los nucleótidos 472 y 480, interacciona con factores de iniciación de la traducción como eIF-2 y que este cambio de C-U en 472 cambia esta interacción, resultando en un decremento en la eficiencia traduccional de la poliproteína viral en cepas atenuadas de poliovirus; otra mutación importante para producir atenuación parece involucrar la sustitución de una G por una A en la posición 482 en esta región (Fields, 1990; Minor et.al, 1993).

Ahora bien, específicamente, la remoción de los nucleótidos 630-726, 622-726 ó 600-726 de poliovirus tipo 1 (Sabin) no altera sus propiedades fenotípicas "in vitro" como el tamaño de placa, mientras que deleciones más extensas 570-726 ó 564-726 aunque producen progenie viral, los virus mutantes exhiben un fenotipo de placas pequeñas, debido a crecimiento retardado, asumiendo que los cambios fenotípicos observados en estas mutantes se deben principalmente a una función alterada de un elemento control de traducción que actúa en cis, lo cual podría llevar a concluir que este se hallaría hacia abajo de la región entre las bases 564-600 (Agol, 1991).

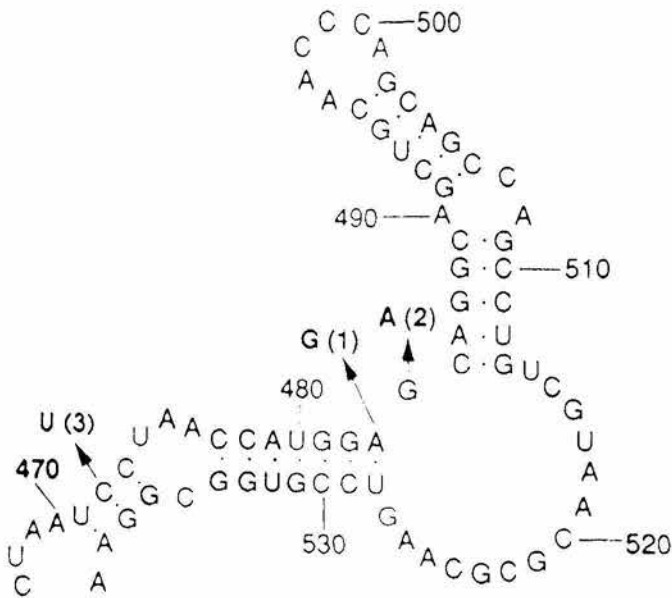
Otros experimentos con genomas contruidos con segmentos derivados de cepas atenuadas y virulentas, han establecido ambigualmente que el fenotipo de la cepa Sabin tipo 1 (Kawamura et al, 1989) tipo 2 (Moss et al, 1989) y tipo 3 (Westrop et al, 1989) es debida parcialmente a las peculiaridades de su RNT 5'; particularmente del segmento comprendido entre los nucleótidos 472-481 (Almond, 1987; Nomoto y Wimmer, 1987; Racaniello, 1988; Agol, 1988; Agol, 1991).

Diversas líneas de evidencias sugieren que la expresión fenotípica de las mutantes atenuadas localizadas en la región 472-481 de la RNT 5' es tejida específica; pues se construyeron 2 cepas que difieren una de la otra solo en la posición 472 de su cepa derivada tipo 3; donde se ha mostrado que produce un log menos de virus al probarla en células de neuroblastoma humano (pero no en HeLa) (La Monica y Racaniello, 1989; Agol et al, 1989; Agol. 1991).

Otras evidencias de la dependencia del huésped de la expresión de mutaciones en la región 472-481 del RNA de poliovirus es el hecho de que las mutantes exhiben un fenotipo de termosensibilidad en ciertos tejidos. Aunque esto originalmente sugirió que la mutación puntual atenuante en la RNT 5' de poliovirus podría conducir a un cambio dramático en la estructura secundaria (Evans et al, 1985).

Las mutaciones atenuadas en la RNT 5' localizadas en el dominio **VI** (Fig. 7) del IRES de poliovirus, modifican de diferente manera la estructura secundaria. Para el tipo 2 está localizada en el loop interno que puede influir para la generación de una estructura altamente ordenada y/o interacciones con factores que actúan en trans; mientras que la mutación atenuada en los otros 2 serotipos, al parecer, desestabilizan una pequeña estructura de tallo. La sensibilidad del IRES a una mutación sutil, sugiere que mucho del IRES es requerido ya sea para la interacción directa de un factor que actúa en trans ó para mantener la estructura conformacional del IRES necesario para su interacción (Wimmer, 1993).

Lo interesante es el hecho de que esta estructura es conservada en varios picornavirus, como ya se mencionó (Rivera et al, 1988; Del Angel, 1990), lo cual es indicativo de que la estructura debe jugar un papel muy importante en el proceso replicativo del virus. La mayor cantidad de estructuras se localizan entre las base 300 a la 630, lo cual constituye la zona de independencia al "cap" para traducción.



**Figura 7.-** Dominio VI de la RNT 5' de poliovirus tipo 3, mostrando la localización de los nucleótidos involucrados en el fenotipo atenuado (nt 472) y los cambios correspondientes a los otros dos tipos. (Tomado de Minor, 1993).

#### **TRADUCCION CAP-INDEPENDIENTE:**

Como se sabe el primer evento después de la entrada del virus a la célula es la traducción, por lo tanto es importante explicar la manera en que ocurre este proceso durante la infección con poliovirus. Dentro de la familia a la que pertenece poliovirus, el proceso de traducción difiere significativamente del proceso llevado a cabo por los mensajeros celulares. Los RNA's mensajeros virales de esta familia carecen de la estructura "cap", que como ya se mencionó anteriormente, es una guanina metilada en la posición 7 la cual es de vital importancia para la unión del ribosoma mediada por el factor eIF-4F, en su lugar se halla la proteína VPg localizada en los mensajeros virales de los miembros de la familia Picornaviridae (Schmid y Wimmer, 1994).

Las secuencias, al parecer, involucrados en mediar la independencia al "cap" se encuentran ubicadas entre las bases 300 a la 630, que se caracteriza por tener estructura secundaria muy compleja.

Experimentos realizados por Svitkin en 1984 con extractos de células HeLa y empleando RNA de diferentes cepas de poliovirus, mostraron que la eficiencia de traducción está relacionada con mutaciones puntuales en la región central de la RNT 5' en las bases 472 y 482, lo cual apoya la hipótesis de elementos regulatorios en el genoma viral para la unión del ribosoma en la parte interna del templado. Por estudios con deleciones se ha logrado determinar que el ribosoma se une a la RNT 5' entre las bases 141-620 (Pelletier

et. al, 1988; Del Angel, 1990). La unión interna del ribosoma al mRNA viral, permite conocer que a diferencia de la traducción de los RNA mensajeros celulares, la traducción del RNA mensajero viral no sigue el mecanismo de barrido desde el extremo 5' hasta el codón AUG, la cual parecía ser universal (Del Angel, 1990).

Así mismo, análisis de deleciones en poliovirus tipo 2 revelaron que secuencias entre los nucleótidos 320-631 fueron suficientes para la traducción cap-independiente en extractos de células infectadas con poliovirus. En estudios con poliovirus tipo 3, con mutaciones a lo largo de los nucleótidos 220-499 se ha visto una reducción dramática de la traducción cap-independiente tanto "in vitro" como "in vivo" (Trono, 1988).

Durante el curso de la infección por poliovirus, hay una reducción considerable en la síntesis de proteínas celulares; en el caso de células HeLa infectadas con este virus la inhibición ocurre rápidamente, a la media hora de la unión del virus, penetra a la célula y desnuda su genoma (Fields, 1990).

La inhibición en la síntesis de proteínas se ha explicado de varias formas. Una de ellas, el aumento en la concentración de Na<sup>+</sup> intracelular se incrementa considerablemente como consecuencia de la modificación en la permeabilidad de la membrana celular (Nair, 1984); otra forma, por la acumulación de RNA de doble cadena, que llevan a la inactivación por fosforilación del factor eIF-2 requerido para la iniciación de la síntesis de proteínas, y también por habilidad del RNA viral para autocompetir con el RNA celular por los componentes de la maquinaria traduccional de ésta



(Carrasco, 1987; Ehrenfeld, 1984; Fields, 1990). Así mismo se ha determinado que la infección con poliovirus, causa el procesamiento de una proteína de 220,000 daltones (P220), la cual forma parte del complejo llamado "complejo que se une al cap" y que es una subunidad del factor eIF-4F necesario para la traducción cap-dependiente. La consecuente degradación de esta proteína lleva a la utilización preferencial de templados virales para traducirse en ausencia de cap, este fenómeno se ha observado en infecciones con Enterovirus, Rinovirus y Aftovirus (Cajero, 1992; Ehrenfeld, 1984, 1992; Agol, 1991). Por ensayos de traducción "in vitro" se ha establecido que entre las bases 320-620 de la RNT 5', se encuentra una región que confiere al mRNA viral la capacidad de traducirse en ausencia de "cap". La eliminación de esta región impide la traducción de mRNA viral (Pelletier et. al, 1988); esta función requiere de un elemento que actúa en "cis", así como de ciertos factores celulares.

Por último, se ha descrito la fosforilación de la subunidad alfa del factor eIF-2 que constituye uno de los mecanismos de inhibición de la traducción de los RNA's mensajeros celulares más estudiados; pues es el acarreador del tRNA iniciador y de GTP, ambos necesarios para la unión de la subunidad ribosomal 40S al extremo 5' del mRNA a traducirse. Esta inactivación y la presencia de elementos regulatorios en la RNT 5' permiten la unión y reconocimiento de ribosomas con sitios internos del templado de RNA (Agol, 1991).

Uno de estos elementos regulatorios, es aquel que actúa en "cis" dentro de la RNT 5' el cual se une a factores celulares que

probablemente dirigen a la subunidad 40S hacia una región de más de 100 bases hacia abajo del codón iniciador AUG, sugiriendo que las proteínas celulares que participan de la unión del ribosoma al IRES "internal ribosome entry site" (Jang, 1988) pueden actuar directamente con el sitio de reconocimiento del ribosoma (Sonenberg, 1989; Jackson, 1990; Gebhard, 1992).

Se han observado estos complejos RNA-Proteínas con la RNT 5' de poliovirus, entre otras el factor eIF-2, entre los nucleótidos 98-182 y 510-629 (Del Angel, 1989). Así mismo, se han observado proteínas que interactúan con diferentes regiones de la RNT 5' de poliovirus. Una de estas es el polipéptido de 50 KDa que se une covalentemente a un residuo de uracilos en el loop del dominio IV (Najita, 1990; Meerovitch, 1993). Proteínas de células HeLa también interactúan con los nucleótidos 186-220 en el dominio IV y los nucleótidos 260-415 en el dominio V (Dildine y Semler, 1992; Meerovitch, 1993). Así mismo, se ha observado que por ensayos de entrecruzamiento (RNA-Proteína) se unen proteínas de 38 y 48 KDa a los nucleótidos 286-456 al parecer proteínas específicas para la traducción de poliovirus (Gebhard, 1992).

Meerovitch y cols. (1989) identificaron una proteína de 52 KDa en células HeLa que puede unirse entre los nucleótidos 559-624 a la RNT 5' de poliovirus estimulando, al parecer la traducción del RNA de poliovirus cuando es purificada de células HeLa (Gebhard, 1994; Meerovitch, 1993). Además, se ha observado que una proteína de 57 KDa aislada de lavados ribosomales de células HeLa se une a la RNT 5' de poliovirus, hacia arriba de un tracto de oligopirimidinas

(Pestova, 1991; Gebhard, 1994). P57 es idéntica a la proteína que se une a la RNT del virus de la Encefalomiocarditis y que es esencial para la función del IRES.

Todas estas evidencias sugieren que la región entera es importante, ya sea para una interacción directa con la maquinaria traduccional ó bien para mantener la estructura secundaria ó terciaria necesaria para esta interacción (Kuge y Nomoto, 1987; Trono, et.al, 1988; Dildine y Semler, 1989; Dildine, 1991).

Por todo esto y por la importancia que reviste el estudio de la Regulación de la traducción utilizando como sistema de estudio un modelo viral como poliovirus, nos planteamos los siguientes objetivos:

**OBJETIVO GENERAL:**

**ESTUDIAR EL EFECTO DE MUTACIONES PUNTUALES EN LA RNT 5' DE POLIOVIRUS TIPO 3 EN TRADUCCION Y EN REPLICACION.**

**OBJETIVOS PARTICULARES:**

- A) PRODUCIR VIRUS MUTANTES A PARTIR DEL cDNA GENERADO IN VITRO.**
  
- B) DETERMINAR EL COMPORTAMIENTO DE MUTANTES EN CUANTO A SINTESIS DE RNA, PROTEINAS, Y PRODUCCION DE VIRUS A DOS DIFERENTES TEMPERATURAS Y EN DOS LINEAS CELULARES.**

## MATERIALES.

### Material Biológico:

\* Células: Se usaron células HeLa S3 crecidas en suspensión y en monocapa para plaqueo a una confluencia del 80-90%. Así como la línea celular SK-N-SH de neuroblastoma humano crecidas en monocapa (La Monica, 1988) para los ensayos de traducción y replicación.

\* Bacterias: **CJ 236** (E.coli, dut<sup>-</sup>, ung<sup>-</sup>, cam<sup>r</sup>, F'), **DH5 $\alpha$**  (E.coli, supE44 $\Delta$ LacU169 $\phi$ 80LacZ $\Delta$ M15hsdR17recA1gyrA96thi-1relA1), **JM 109** (E.coli, recA1supE44endA1hsdR17gyrA96relA1thi $\Delta$ lac-proAB), **JM 101** (E.coli, supEthi $\Delta$ lac-proABF'traD36proAB<sup>+</sup>lacI<sup>q</sup>lacZ $\Delta$ M15).

\* Virus: Se usaron las cepas virales PRV 6.1, PRV 7.3, V957, SFP7, SPF8, propagadas en el laboratorio sobre células HeLa en suero de caballo.

\* Sueros: Suero de neonato (Bioexport), Suero fetal bovino, Suero de caballo, Gibco BRL.

\* Medios de cultivo: Medio Dulbecco (D-MEM) Gibco BRL, y Dulbecco deficiente en metionina.

### SOLUCIONES:

Medio de cultivo para bacterias:

\* Luria Líquido:

Bacto-triptona	10 gr.
Bacto extracto de levadura	5 gr.
NaCl	10 gr.

Ajustar pH 7.5 con NaOH 2 N, agua hasta 1 Lt, esterilizar en autoclave 20 min.

\* Medio 2 XYT:

Bacto-triptona	16 gr.
Bacto extracto de levadura	10 gr
NaCl	5 gr

Esterilizar en autoclave.

\* Top-Agar para plaqueo:

Bacto-triptona	10 gr.
NaCl	10 gr.
Bacto extracto de levadura	5 gr.
Bacto-Agar	0.7%

Llevar a 1 Lt, con agua y esterilizar en autoclave.

\* Luria sólido.

Se prepara igual que el luria líquido mas 15 gr de Bacto-agar por cada litro.

\* Luria-cloramfenicol:

Se prepara igual que el luria sólido; se esteriliza en autoclave y se adiciona cloramfenicol a una concentración final de 25 µg/ml.

\* Medio Mínimo M9: para JM 101 y JM 109

Fosfato de sodio dibásico	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	6 gr.
Fosfato de potasio monobásico	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3 gr.
Cloruro de amonio	$\text{NH}_4\text{Cl}$	1 gr.
Cloruro de sodio	NaCl	0.5 gr.

Esterilizar en autoclave y adicionar

MgSO <sub>4</sub> 1M	1 ml.
Glucosa	2 gr.
CaCl <sub>2</sub> 1M	0.1 ml.
Tiamina-HCl 1M	1 ml.

Se esteriliza por filtración antes de adicionar al medio frío.

Bacto-agar            15 gr/Lt.

Se esteriliza aparte en autoclave.

### PURIFICACION M13

\* Gradiente de Sacarosa 5-20 %

Sacarosa	5 gr.	5%	EDTA	5mM
Sacarosa	20 gr	20%		
NaOH		0.3N		

NaCl            0.7M

\* Solución para resuspender ácidos nucleícos.

Buffer TE

Tris	10 mM
EDTA	0.1 mM pH 8

Esterilizar en autoclave.

\* Solución para precipitar fagos

PEG 8000	15%
NaCl	2.5 M

Esterilizar en autoclave.

\* Tris-acetato: cuantificación de fracciones.

Trizma Base    1M    pH 5.8

Ajustar pH con ácido acético, esterilizar en autoclave.

\* Solución para precipitar ácidos nucleícos.

Acetato de Sodio 3M pH 5.8

Ajustar pH con ácido acético y esterilizar en autoclave.

## MUTAGENESIS DIRIGIDA

### -Fosforilación Oligonucleótidos.

#### \* Amortiguador 2X OKB:

Tris	25 mM	pH 7.5
MgCl <sub>2</sub>	12 mM	
ATP	1 mM	
DTT	10 mM	
EDTA	0.2 M	
Espermidina	1 M	

### - Hibridación de oligonucleótidos-M13

#### \* Buffer 10X A

NaCl	0.5 M	
Tris	0.4 M	pH 7.5
MgCl <sub>2</sub>	0.2 M	

### - Síntesis de cadena complementaria.

#### \* Buffer 2XB

Tris	1M	pH 7.5
MgCl <sub>2</sub>	1M	
DTT	0.5 M	
EDTA	0.2 M	pH 7.5
dNTP	50 mM	
ATP	100	
H <sub>2</sub> O	bidestilada estéril.	

## SOLUCIONES PARA TRANSFORMACION BACTERIANA.

#### \* Solución de β-mercaptoetanol 250 mM:

β-mercaptoetanol	9 μl
agua bidestilada	491 μl



### SOLUCIONES PARA EXTRACCION FENOLICA.

\* Fenol saturado con Tris-HCl pH 7.5

\* Cloroformo-OH isoamílico 24:1

Alcohol isoamílico	4 ml
Cloroformo	96 ml

\* Etanol absoluto frío

### SOLUCIONES PARA GELES DE AGAROSA.

\* Agarosa en TBE 1X

1 gr/ 1%
0.7 gr/.7%

\* Amortiguador TBE 10X

Trizma Base	108 gr.
Acido Bórico	55 gr.
EDTA	9.3 gr

Aforar a 1 Lt. y esterilizar en autoclave.

\* Amortiguador TBE 0.5X de corrida.

TBE 10X	50 ml
agua	950 ml

### SOLUCIONES PARA GELES DE SECUENCIACION.

\* Acrilamida-Bis acrilamida 40% 19:1

Acrilamida	38 gr.
Bis-acrilamida	2 gr.

Aforar a 100 ml con agua bidestilada. Filtrar a través de millipore 0.45  $\mu$ m. Guardar a 4°C

\* Mezcla de Poliacrilamida-Urea.

Sol. stock 40%	3.75 ml
TBE 10X	2.5 ml
agua bidestilada	10 ml
Urea	10.5 gr.

\* Soluciones para polimerizar.

Persulfato de amonio 10%	150 $\mu$ l
TEMED	25 $\mu$ l

\* Buffer de corrida TBE 1X

Buffer TBE 10X	100 ml
agua bidestilada	900 ml

**SOLUCIONES PARA FIJAR GELES DE SECUENCIACION.**

\* Acido tricloroacético 10%

TCA	100 ml
agua bidestilada	900 ml

**SOLUCIONES PARA GELES DE POLIACRILAMIDA AL 10 %**

\* Solución A:

Acrilamida	30 gr
Bis-acrilamida	0.8 gr.

Aforar 100 ml con agua bidestilada y filtrar a traves de 0.22  $\mu$ m.  
Guardar a 4°C

\* Solución B:

Trizma Base	12.11 gr
-------------	----------

Ajustar pH a 8.8 con HCl, aforar a 100 ml con agua bidestilada.  
Guardar a 4°C

\* Solución C:

SDS 10 %            10 gr.

Aforar a 100 ml. Guardar a temperatura ambiente.

\* Solución D:

Trizma Base            12.11 gr

Ajustar pH 6.6 con HCl, aforar a 100 ml. Guardar a 4°C

\* Persulfato de amonio 10%

Persulfato de amonio        1 gr.

Aforar a 10 ml. Guardar a 4°C. No usar con mas de 1 mes de preparada.

\* Preparación del Gel Separador:

Solución A	10 ml
Solución B	11.25 ml
Solución C	300 $\mu$ l
Agua	8.25 ml
TEMED	50 $\mu$ l
Persulfato 10%	120 $\mu$ l

\* Preparación del Gel Concentrador:

Solución A	2.66 ml
Solución D	2.5 ml
Solución C	200 $\mu$ l
Agua	14.4 ml
TEMED	20 $\mu$ l
Persulfato 10%	300 $\mu$ l

\* Buffer de muestra 2X:

Sol. D	1 ml
Sol. C	2 ml
$\beta$ -mercaptoetanol	0.1 ml
Glicerol	6 ml
Agua	0.8 ml
Azul de Bromofenol	1%

\* Buffer de Corrida 10X

Glicina	144 gr.
Trizma Base	30 gr.
SDS 10%	100 ml

Aforar a 1 Lt. Se utiliza 1X para la electroforesis.

\* Solución para teñir geles

Azul de Coomasie R-250	0.2%
Metanol	50%
Acido acético	7%

\* Solución para desteñido

Metanol	30%
Acido acético	7%

**SOLUCIONES PARA CINETICAS DE TRADUCCION-REPLICACION.**

\* Dulbecco carente de Metionina

Dulbecco deficiente	9.4 gr.
Bicarbonato de Sodio	2.2 gr.

Aforar a 1 Lt. Filtrar en campana.

\* Amortiguador RSB-NP 40

NaCl	10 mM
Tris- HCl pH 7.5	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
NP-40	1%

\* Amortiguador de Despegado para células SK-N-SH.

Tris-HCl pH 7.5	40 mM
EDTA	1 mM
NaCl	150 mM

### SOLUCIONES PARA PLAQUEO VIRAL.

- \* Solución de PBS 1X/Suero de caballo para diluciones

NaCl	8 gr.
KCl	0.2 gr.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15 gr.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 gr.
Suero de caballo	.2 ml

Aforar a 1 Lt. y esterilizar en autoclave ó filtración.

- \* Medio D-MEM 2X; Gentamicina 2X, Suero de Caballo 10%

Disolver un sobre completo de medio Dulbecco modificado.

-3.7 gr. de bicarbonato de sodio. Llevarlo a 450 ml.

Filtrarlo en campana. Adicionar 50 ml de suero de caballo y 1 ml de Gentamicina.

- \* Bacto-Agar 2%

Bacto-agar	20 gr.
------------	--------

Aforar a 1 Lt, esterilizar en autoclave.

### SOLUCION CRISTAL-VIOLETA PARA TERNIR MONOCAPA CELULAR.

- \* Solución cristal-violeta stock

cristal-violeta	1.09 gr.
etanol 20 %	99 ml

- \* Solución cristal-violeta trabajo

Sol. stock	20 ml
etanol 95%	40 ml
agua bidestilada	150 ml

### SOLUCION AGUA-DIETIL PIROCARBONATO (Agua DEP)

\* DEP 100  $\mu$ l para cada 100 ml de agua bidestilada estéril. Se agita fuertemente dejandose reposar de 4 a 24 hrs. Se esteriliza en autoclave.

### SOLUCIONES PARA TRANSCRIPCIÓN "IN VITRO"

- \* Buffer de Transcripción 5X                      Promega
- \* DTT 100 mM    Promega
  
- \* Solución de nucleótidos para marcaje radiactivo.
  - ATP    2.5 mM
  - CTP    2.5 mM
  - GTP    2.5 mM
  - UTP    0.25 mM

### SOLUCIONES PARA SLOT-BLOT.

- \* Solución stock SSC 20X
    - Citrato de sodio dihidratado                      47.5 gr
    - NaCl    175.2 gr
- Ajustar pH a 7.4 con HCl, aforar a 1 Lt. Esterilizar en autoclave
- \* Solución SSC 10X para lavar filtros
    - SSC 20X    500 ml
- Llevar a 1 Lt. con agua bidestilada estéril.
- \* Solución SSCPE 5X
    - NaCl    150 mM
    - citrato de sodio                                      15 mM
    - $\text{KH}_2\text{PO}_4$     13 mM
    - EDTA    1 mM

Ajustar pH a 7.2 con NaOH . Esterilizar en autoclave.

\* Solución SSC-Formaldehído

SSC 20X	50 ml
Formaldehído	4.6 ml
Agua bidestilada	0.4 ml

\* Denhardt's

Ficoll	1%
BSA	1%
Polivinilpirrolidona	1%

\* DNA de espermatozoos de Salmón 10 mg/ml. Boehringer.

Se disuelve por calentamiento y posteriormente se hierve. Después se pasa 20 veces por una jeringa con aguja del no.20 y se guarda a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**ISOTOPOS RADIATIVOS UTILIZADOS**

- \* UTP- $\alpha\text{P}^{32}$  actividad específica 3000 Ci/mmol NEN DuPont
- \* Metionina L- $^{35}\text{S}$  actividad específica 1000 Ci/mmol NEN DuPont.
- \* d-ATP  $^{35}\text{S}$  actividad específica 600 Ci/mmol NEN DuPont.

**ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y MODIFICACIÓN UTILIZADAS**

- \* Sca I Biolabs.
- \* Polinucleótido Kinasa T4 Gibco, BRL.
- \* DNA ligasa T4 Gibco, BRL.
- \* DNA polimerasa Fragmento Klenow Boehringer.
- \* DNA polimerasa sequenasa United States Biochemical.
- \* RNA polimerasa T7 Promega
- \* DNAasa RQ1 Promega
- \* RNAsin Promega
- \* DNA polimerasa T4 Gibco, BRL.

## MÉTODOS

### Purificación de M13 cadena sencilla.

Para la purificación de M13 cadena sencilla, se dejó crecer la cepa CJ 236 en Luria-cloramfenicol (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) toda la noche; se tomaron de este cultivo 100  $\mu\text{l}$  que se adicionaron a 200 ml de medio Luria-CAM, creciéndose 6 hrs en agitación a 37°C. Transcurrido éste tiempo, se adicionaron aproximadamente  $10^7$  fagos que tienen clonada la RNT 5' de poliovirus (cepa León); manteniéndose este cultivo en agitación a 37°C por al menos 18 hrs más. Al término de este tiempo se centrifugaron las células a 5000 rpm, 30 min, 4°C (centrífuga Beckman J2-21, rotor JA-20); el sobrenadante obtenido se utilizó en la titulación del fago. Este se llevó a cabo creciendo en medio Luria la cepa JM 109 (silvestre) y la CJ 236 (mutante) hasta que llegaran a fase logarítmica y se prepararon las diluciones pertinentes del fago. Una vez que ambas cepas alcanzaron la fase log, se tomaron 100  $\mu\text{l}$  de cada dilución y 200  $\mu\text{l}$  de bacterias (JM 109 y CJ 236) y se incubaron a 37°C, 15 min. Se les adicionó 3 ml de top-agar fundido y mantenido a 45° C, se mezcló y se vació sobre cajas de Luria ó Luria-CAM (CJ 236) incubándose toda la noche a 37° C.

Después se verificó que el plaqueo resultante diera una diferencia de 5-6 logaritmos menor en la cepa JM 109 con respecto a la CJ 236 procediendo a añadir al sobrenadante 1/4 de volumen de PEG-8000 w/v 15 %-NaCl 2.5 M; se mezcló bien y se colocó en hielo por 60 min. Después se centrifugó 5000 rpm, 30 min, 4° C la pastilla obtenida se dejó secar y se resuspendió en buffer TE-NaCl 10 mM (500  $\mu\text{l}$ ); se dividió a la mitad el volumen total y a uno de ellos se le adicionó SDS a una concentración final de 1%; se mezcló y se calentó durante 10 min a 55° C. El fago se colocó en un gradiente alcalino de sacarosa del 5-20% y se corrió en el rotor SW 41, 16 hrs, 34 000 rpm 10°C, al terminó de la centrifugación se colectaron fracciones de 500  $\mu\text{l}$  desde el fondo del tubo, se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de Tris- acetato y se leyeron al espectrofotómetro



a 260 nm. Los picos de mayor absorbancia (fracciones 1-10) se colocaron en tubos rígidos de polipropileno (oak-rigde), se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío centrifugándose en el rotor 50 Ti, 30 min, 25 000 rpm, 4°C. La pastilla obtenida se resuspendió en buffer TE 1X, se adicionó acetato de sodio 3M y etanol absoluto, precipitándose a -70°C, 30 min. Se centrifugó y la pastilla obtenida se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en TE 1X, cuantificándose por absorbancia a 260 nm.

#### **FOSFORILACION DE OLIGONUCLEOTIDOS PARA MUTAGENESIS DIRIGIDA.**

Se tomaron 2-2.5µg de oligonucleótidos (0.5 µg/ml) cuyas secuencias se diseñaron en base a la secuencia del cDNA de la cepa León y son los siguientes:

Oligo 472: 5' CATGGTTAGAATTAGCCGCA 3'

Oligo 482: 5' AGCTGCCTGCTTCATGGTTAG 3'

Oligo 529: 5' GTTCCGCCACGAACTTGCGCG 3'

antes de alinearse al templado de DNA (M13 cadena sencilla) se fosforilaron adicionándose 2 µl de amortiguador 2X OKB, llevándose a un volumen final de 20 µl y se adicionó 1 µl (10 U) de enzima Polinucleótido kinasa (Gibco, BRL). Se incubaron durante 60 min a 37°C. La mezcla se guardó a -20°C.

#### **HIBRIDACION DE OLIGONUCLEOTIDOS FOSFORILADOS CON M13 (Annealing)**

Se colocaron 2.4 µg de fago M13 cadena sencilla purificado, que tiene clonada la RNT 5' con 125 ng de oligonucleótidos (472,482 y 529) fosforilados, 1 µl de amortiguador 10X A llevándose a un volumen final de 10 µl con agua bidestilada estéril. Se calentaron las muestras a 65°C, 5 min y después se permitió el enfriamiento lento a temperatura ambiente .

#### **SINTESIS DE LA CADENA COMPLEMENTARIA.**

A la mezcla anterior de hibridación se le añadieron 10 µl de amortiguador 2XB, 10 U de enzima DNA polimerasa fragmento Klenow,

(Boehringer) ó DNA polimerasa del fago T4 (Gibco, BRL) la mezcla se mantuvo 5 min a temperatura ambiente, después 5 min a 37°C y al final 5 min en hielo. Enseguida se añadieron 2.5 U de DNA ligasa T4 (Biolabs) incubandose la reacción toda la noche a 15°C .

Una vez que se obtuvieron fagos de doble cadena "in vitro" se transfectaron bacterias DH5 $\alpha$  competentes. Para lo cual se dejó crecer la cepa JM 109 ó JM 101 (fase log) en Luria líquido durante 2-3 hrs. Al mismo tiempo se inició el protocolo de transformación bacteriana, descongelandose alícuotas de 300  $\mu$ l de células competentes DH5 $\alpha$  en hielo durante 10 min, se adicionaron 30  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol 250 mM a los 300  $\mu$ l de bacterias y se mantuvieron 10 min más en hielo. Después de éste tiempo se hicieron alícuotas de 50  $\mu$ l de bacterias y se les adicionaron de 1-2  $\mu$ l de DNA ( $\approx$ 25 ng) del fago de doble cadena; se dejaron 45 min en hielo e inmediatamente después se incubaron 90 seg a 42°C, se colocaron nuevamente 2 min en hielo adicionandose después en campo estéril 200  $\mu$ l de JM 109 ó JM 101, incubandose 15 min más a 37°C. Después las bacterias fueron transferidas a tubos de ensaye estériles y se adicionaron 3 ml de top-agar fundido y mantenido a 45°C. Se agitó la mezcla y se vació a cajas de Luria que se incubaron toda la noche a 37°C. De aquí se seleccionaron aquellas placas turbias para su secuenciación.

#### **SINTESIS DE cDNA Y AMPLIFICACION DE LA RNT 5' POR PCR.**

A partir de células HeLa infectadas con el virus V957 de poliomielitis se purificó el RNA viral, este sirvió como molde para la síntesis del cDNA como sigue: 1  $\mu$ g RNA viral, 4  $\mu$ l Buffer 5X, 1  $\mu$ l dNTP's 10 mM c/u, 0.5  $\mu$ l Hexómeros, 1  $\mu$ l DTT 100 mM, 1  $\mu$ l RNAsin, 1  $\mu$ l Transcriptasa reversa Superscrip, agua hasta un volumen final de 20  $\mu$ l, se incubó primero el RNA con los hexómeros por 2 min a 72°C antes de la reacción, después se incubó 1 hr a 37°C y finalmente se hirvió por 5 min. Una vez obtenido el cDNA se hizo la reacción de PCR adicionando 5  $\mu$ l de Buffer 10X Taq pol, 1  $\mu$ l dNTP's 10 mM, 8.1  $\mu$ l oligos 200 ng, 5  $\mu$ l cDNA, 2.5-5 U Taq

polimerasa, agua hasta un volumen final de 50  $\mu$ l y finalmente una gota de aceite mineral. La reacción de PCR se realizó en un DNA Thermal Cycler 480 Perkin Elmer (1 ciclo 94°C 5 min, 35 ciclos 94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1 min, 1 ciclo 72°C 5 min y 4°C) los oligos utilizados se diseñaron a partir de la secuencia del cDNA de la cepa León cuya secuencia es la siguiente:

Oligo 18: 5' GATGGCCAATCCAACCTCG 3'

Oligo 37: 5' TAATACGACTCACTATAGGGGAATCATCGACGCG 3'

#### **EXTRACCION DE FAGOS PARA SECUENCIAR.**

Se creció la cepa JM 109 ó JM 101 en medio Luria líquido toda la noche, transcurrido el tiempo se adicionaron 200  $\mu$ l de bacterias a 1.5 ml de medio 2 XYT más la placa del fago elegida utilizandose capilares ó pipetas pasteur estériles. Se pusieron a crecer 8 hrs en agitación a 37°C. Posteriormente se pasaron las bacterias-fagos a tubos eppendorf estériles y se centrifugaron 10 min, 10 000 rpm; el sobrenadante obtenido se transfirió a tubos nuevos estériles, adicionandose después 150  $\mu$ l de PEG 8000-NaCl manteniendose a temperatura ambiente por 30 min, después de este tiempo, se centrifugó 10 min, 10 000 rpm y se eliminó el sobrenadante totalmente. La pastilla obtenida se resuspendió en agua bidestilada estéril (100  $\mu$ l) y se hizo extracción fenólica adicionandose un volumen igual de fenol saturado con Tris-HCl pH 7.5; la mezcla se agitó y centrifugó 10 min, 12 000 rpm se colectó la fase acuosa y se adicionó un volumen de cloroformo-OH isoamílico 24:1, se agitó nuevamente y se centrifugó 5 min, 10 000 rpm; se volvió a colectar la fase acuosa y se repitió una vez más este paso. A la fase acuosa obtenida se le adicionó 1/10 vol. de acetato de sodio 3M y 2 vols. de etanol absoluto frío, se colocó a -70°C 30 min, después se centrifugó 30 min 4°C 12 000 rpm. La pastilla obtenida fue resuspendida en agua bidestilada estéril y se guardó a -20°C ó se procedió a preparar la reacción de secuenciación.

#### **SECUENCIACION DE FAGOS CANDIDATOS.**

Para la realización de este ensayo se utilizó el Kit de la Sequenase (Sequenase version 2.0 DNA sequencing Kit, United States Biochemical) tomándose 5  $\mu$ l de cada uno de los fagos que se secuenciaron ( $\approx$  200 ng), 2  $\mu$ l de agua, 2  $\mu$ l de buffer de reacción 5X, 1  $\mu$ l de iniciador ó "primer"; se calentó la reacción a 65°C 2 min y se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente (35°C).

Por otra parte se marcaron tubos eppendorf con las letras G,A,T,C, para cada fago, adicionando 2.5  $\mu$ l de cada uno de las mezclas de terminación, las cuales se mantuvieron a temperatura ambiente. La mezcla de marcaje se diluyó 1:5 y también se mantuvo a temperatura ambiente. Después los tubos con las mezclas de terminación fueron precalentados en un baño a 37°C (G,A,T,C) y se procedió a hacer la reacción de marcaje; para lo cual al DNA hibridado al inicio del protocolo y mantenido en hielo, se le adicionó 1  $\mu$ l de DTT 0.1 M, 2  $\mu$ l de la mezcla de marcaje diluída 1:5, 0.5-1  $\mu$ l de dATP-<sup>35</sup>S 600 Ci/mmol, 2  $\mu$ l de la enzima sequenase diluída. Se mezcló bien y se mantuvo a temperatura ambiente 2-5 min. De aquí se tomaron 3.5  $\mu$ l y se transfirieron a los tubos marcados con las letras G,A,T,C, precalentados, se mezclaron bien y se continuó la incubación a 37°C por 5 min más. Se detuvo la reacción adicionando 4  $\mu$ l de la solución stop. Las muestras se calentaron 2 min a 75°C y se corrieron en un gel de secuenciación.

#### **GELES DE POLICRILAMIDA-UREA PARA SECUENCIACION.**

Los vidrios que se utilizaron para preparar el gel de secuenciación fueron lavados perfectamente. Se secaron y limpiaron con etanol absoluto. El vidrio pequeño se siliconizó, se dejó secar y se lavó con agua destilada, retirando el exceso de agua con papel absorbente. Enseguida se procedió a montar ambos vidrios colocando los separadores en las orillas de los vidrios sellandose con cinta adhesiva, y pinzas a los lados de los vidrios únicamente. Estos se colocaron en posición horizontal para añadir la mezcla del gel, la

cual se preparó adicionando solución de acrilamida-bisacrilamida 40% 19:1. TBE 10 X, agua bidestilada estéril y urea. Se mezcló bien la solución y se le adicionaron persulfato de amonio 10% y TEMED. Se vació lentamente y se colocó el peine dejándose polimerizar toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente el gel se montó en la cámara de electroforesis y se corrió en TBE 1X por 30 min a 500 volts; después de esto se colocaron las muestras en los pozos y se llevó a cabo la corrida. Al término el gel se fijó en ácido acético 10 %, durante 10 min, se secó con vacío y calor (80°C) durante 1 hr y se expuso a una placa de rayos X X-omat (24 hrs.)

#### **CINETICA DE SINTESIS DE PROTEINAS VIRALES MARCADAS CON METIONINA S<sup>35</sup>.**

Se crecieron células HeLa S3 en suspensión con medio MEM suplementado con suero de neonato 10% y Gentamicina, tomando el volumen necesario para tener  $8 \times 10^7$  células totales, se centrifugaron en tubos cónicos estériles a 3000 rpm, 10 min. La pastilla se resuspendió en medio MEM (500  $\mu$ l) en esterilidad; este volumen se dividió en dos partes iguales y se infectaron con 10 pfu de cada uno de los virus probados, (PRV 6.1, PRV 7.3, V957, SFP7, SFP8). La adsorción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 45 min en agitación constante. Una vez transcurrido el tiempo de adsorción se adicionaron 20 ml de MEM suplementado con suero fetal al 5%. HEPES 50mM pH 7 y se realizaron las incubaciones a 32°C y 38.5°C en agitación constante; tomándose en este punto la primera alícuota de 1 ml para el tiempo  $T_0$  de la cinética y así se hizo sucesivamente durante 7 hrs.

Cada alícuota de 1 ml fue centrifugada 1 min, 9000 rpm, la pastilla fue lavada con MEM carente de metionina (500  $\mu$ l), se centrifugó nuevamente, y la pastilla obtenida se resuspendió en MEM-metionina S<sup>35</sup> (50 $\mu$ Ci/ml) y se incubó durante 15 min a 32°C ó 38.5°C; nuevamente se centrifugó 5 min, 9000 rpm. La pastilla obtenida fue resuspendida en buffer RSB-NP40 en donde las células se rompen. La mezcla fue centrifugada 10 min, 4°C y el sobrenadante obtenido se recuperó y guardó a -20°C. Estas muestras fueron

analizadas en un gel de poliacrilamida-SDS al 10%.

Este mismo procedimiento se llevó a cabo para las cinéticas realizadas a 37°C con las células SK-N-SH crecidas en monocapa en medio Dulbecco suplementado con suero fetal bovino al 10% y Antibióticos 1X.

#### **GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS PARA PROTEINAS.**

El gel se preparó entre dos placas de vidrio perfectamente bien lavadas; se secaron y se limpiaron con etanol. Se armaron los vidrios y se preparó el gel separador mezclando las siguientes soluciones: solución A, solución B, solución C, agua bidestilada estéril, TEMED y persulfato de amonio. La mezcla se vació lentamente y el gel se aplanó adicionando SDS 1% ó isopropanol. Una vez que gelificó, se retiró la solución de aplanado y se preparó el gel concentrador utilizando las siguientes soluciones: solución A, solución D, solución C, agua bidestilada estéril, TEMED y persulfato de amonio. Nuevamente se vació lentamente hasta el borde superior del peine y se dejó polimerizar a temperatura ambiente toda la noche ó bien por al menos 1 hr. Las muestras fueron preparadas vol-vol en buffer de muestra 2x y se calentaron a 95°C, 3 min. Se colocaron las muestras en los pozos y se corrió el gel a 45-60 volts durante toda la noche en buffer de corrida 1 X. Una vez terminada la corrida, el gel se tñó con azul de Coomassie R-250 y se destñó con metanol 30%, ácido acético 7%; el gel se secó con calor y vació por 2 hrs a 80°C; al final se expuso a una placa de rayos-X X-omat (Kodak).

#### **CINETICA DE REPLICACION VIRAL.**

Células HeLa S3 crecidas en suspensión ( $8 \times 10^7$  cels) se centrifugaron 10 min, 3000 rpm; la pastilla se resuspendió en MEM y se dividió en 2 partes iguales y se infectaron con 10 pfu de los virus probados (PRV 6.1, PRV 7.3, V957, SFP7, SFP8) los cuales fueron preparados en medio MEM solo; se permitió la adsorción a

temperatura ambiente durante 45 min en agitación constante y transcurrido este tiempo se adicionaron 20 ml de MEM suplementado con suero fetal 5% y HEPES 50 mM pH 7 a cada piloto de infección realizándose la incubación a 32°C ó 38.5°C en agitación. En este punto de tomó la primera alícuota de 1 ml que correspondió al tiempo  $T_0$  y así se hizo sucesivamente durante 7 hrs. Cada alícuota tomada fue centrifugada 1 min a 9000 rpm; la pastilla se resuspendió en buffer RSB-NP40 en donde las células se rompen y se volvió a centrifugar 10 min, 12 000 rpm a 4°C. El sobrenadante obtenido se recuperó y guardó a -20°C para realizar la extracción de RNA, adicionando SDS 5%, fenol saturado con tris y cloroformo-OH isoamilico 24:1 llevándose a cabo la extracción hasta que se observó una interfase completamente clara. Después se adicionaron acetato de sodio 3M y etanol absoluto frío para precipitar el RNA a -20°C toda la noche. Se recuperó el RNA por centrifugación, 30 min, a 4°C y se resuspendió en agua DEP para los ensayos de Slot-Blot. Este mismo procedimiento se llevó a cabo para las cinéticas realizadas a 37°C en las células SK-N-SH crecidas en monocapa.

#### **PLAQUEO DE VIRUS.**

Para los ensayos de plaqueo viral se cultivaron células HeLa en monocapa (60 mm diámetro) a una confluencia del 80-90% Los ensayos se realizarón retirando el medio de la monocapa; se lavó con PBS 1X y suero de caballo 0.2%. Se preparon las diluciones pertinentes de cada virus en la misma solución con la que se lavaron las células y se adicionaron 100  $\mu$ l de cada dilución a las monocapas, incubándose a 37°C por 45 min, cada 15 min se movieron para homogenizar la adsorción viral. Al término de este tiempo se retiró la dilución y se cubrió la monocapa celular infectada con 5 ml de D-MEM 1X, Gentamicina 1X, Bacto-agar 1% fundido y mantenido a 45°C. Este medio se dejó solidificar a temperatura ambiente y se incubaron las cajas a 37°C durante 48 hrs. Después de este tiempo se añadieron 3 ml de TCA 20% para fijar la monocapa celular durante

10 min, se removió la capa de agar y enseguida se adicionaron 2 ml de la solución de cristal-violeta, dejándolo 10 min a temperatura ambiente. Al final las cajas fueron lavadas con agua y escurridas

Las placas líticas obtenidas se contaron y se obtuvo el título viral.

#### **SINTESIS DE RIBOSONDAS:**

El plásmido pRM que posee una secuencia que codifica para la proteína VP2 de poliovirus clonada en el vector de expresión pGEM-4Z fue utilizado para la síntesis de la ribosonda. Este plásmido fue cortado con la endonucleasa de restricción Sca I (Biolabs) de acuerdo a las condiciones especificadas por el proveedor.

La restricción se confirmó en gel de agarosa al 1% corrido en buffer TBE 0.5 X y se procedió a transcribir el plásmido cortado utilizando la RNA polimerasa del bacteriofago T7. Se obtuvo la secuencia complementaria del RNA que se hibridó con el RNA viral previamente fijado a filtros de nitrocelulosa.

El transcrito obtenido se cuantificó en un contador de líquido de centelleo; tomándose 1  $\mu$ l de la sonda marcada con  $^{32}$ P (3000 Ci/mmol) y se colocó en un filtro Whatman DE81, se dejó secar a temperatura ambiente; el filtro se colocó en un vial para radiactividad, se adicionó líquido de centelleo omnifluor-tolueno y cuantificó la radiactividad incorporada. Para la hibridación se pusieron  $2 \times 10^6$  cuentas/ml. La sonda fue hervida 10 min e inmediatamente después se colocó en hielo por 5 min más antes de añadirla a la mezcla de hibridación.

#### **ENSAYOS DE TRANSCRIPCION "In vitro".**

A partir del DNA cortado previamente con la enzima Sca I se hizo una extracción fenólica adicionando 1 vol. de fenol saturado con Tris-HCl pH 7.9, se centrifugó para separar las fases, se colectó la fase acuosa y se adicionó cloroformo:OH isoamílico 24:1 y nuevamente se centrifugó; se volvió a colectar la fase acuosa y se



repetió este paso una vez más. Se precipitó el DNA con acetato de sodio 3M y etanol absoluto frío. El DNA se resuspendió en agua DEP y se preparó la mezcla de transcripción de la siguiente manera: 8  $\mu$ l agua DEP, 6  $\mu$ l buffer transcripción 5X, 3  $\mu$ l DTT 100 mM, 1  $\mu$ l RNAsin, 6  $\mu$ l NTP para marcaje (2.5 mM ATP, GTP, CTP y 0.25 mM UTP); 2  $\mu$ l UTP  $^{32}$ P 3000 Ci/mmol, 3  $\mu$ l DNA (1  $\mu$ g), 1  $\mu$ l RNA polimerasa T7. Se incubó a 37°C por 1 1/2 hrs. Después se adicionó DNAasa RQ1 y se incubó a 37°C, 10 min más. El transcrito obtenido se precipitó con acetato de sodio 3 M y etanol a -20°C toda la noche. Se recuperó la ribosonda centrifugando 30 min a 4°C y finalmente se resuspendió en agua DEP, cuantificandose después.

#### **SLOT-BLOT DE RNA VIRAL.**

El RNA viral obtenido de las cinéticas de replicación a diferentes temperaturas se utilizó para los ensayos de hibridación tipo slot-blot. Para lo cual se fijó el RNA a filtros de nitrocelulosa mediante calor. Para llevar a cabo esto se humedecieron los filtros de nitrocelulosa en buffer SSC 10X. Este se colocó en el aparato de slot-blot y se pasaron 400  $\mu$ l de buffer SSC 10X a través de los pozos para lavarlos. Se prepararon los RNA's a fijar adicionando 2-3  $\mu$ l de los RNA's obtenidos mediante las cinéticas, 300  $\mu$ l de SSC-formaldehído y 100  $\mu$ l de agua DEP, se calentaron a 65°C, 15 min justo antes de usarse. Al término de este tiempo se colocaron las muestras en los pozos y se pasaron a través de los filtros de nitrocelulosa mediante vacío; se volvieron a lavar los pozos con 400  $\mu$ l de SSC 10X. El papel se horneó a vacío a 80°C por 2 hrs ó bien se usó un U.V stratalinker durante 1 min .

La prehibridación se realizó utilizando la siguiente mezcla: Formamida 50%, SSCPE 5X, Denhardt's 5X, DNA esperma de salmón (250  $\mu$ g/ml) a 42°C por 4 hrs como mínimo; después se llevó a cabo la hibridación con la sonda marcada, utilizando la mezcla de hibridación que contiene: Formamida 50%, SSCPE 5X, Denhardt's, agua DEP, DNA esperma de salmón, Dextran sulfato 2%. A esta mezcla se le adicionó la sonda previamente hervida por 10 min y se llevó a cabo

la hibridación a 42°C toda la noche. Al terminó de la hibridación, los filtros de nitrocelulosa se lavaron con SSC 2X, SDS 0.1% 2 veces a temperatura ambiente por 15 min y 2 veces a 65°C en la misma solución por 15 min. Los filtros se expusieron a una placa de rayos X X-omat (Kodak), a 4°C por 24 hrs.

## RESULTADOS

Cambios puntuales en esta región, principalmente en el dominio **VI** de la RNT 5', (**Fig. 7**) son los responsables de alteraciones ó modificaciones fenotípicas de las cepas virales (Dildine, 1989; 1991; Kawamura, 1989; Macadam, 1993; Nomoto, 1987; Westrop, 1989; Skinner, 1989; Rivera, 1988).

Por esto, se trabajó con virus recombinantes que poseen las siguientes características: **PRV 6.1** contiene la RNT 5' de la cepa León y la región codificante de la cepa Lansing. Este virus es neurovirulento en ratón, con un LD 50 de  $< 6 \times 10^2$  (**Cuadro I**). **PRV 7.3** contiene la RNT 5' de la cepa vacunal Sabin 3, en donde se encuentra una mutación en la base 472 (C 472 U), y es atenuado (**Cuadro I**) con un LD 50 de  $> 2 \times 10^7$ . **SFP8** es un doble mutante con cambios en las posiciones 472 (C 472 U) y 482 (G 482 A) tiene un fenotipo más atenuado que el PRV 7.3, con un LD 50 de  $1.6 \times 10^8$  (**Cuadro I**). **V957** es un revertante neurovirulento del SFP8 con cambios en las bases 482 (G 482 A) y 529 (C 529 U) (**Cuadro I**) y un LD 50 de  $< 5.5 \times 10^4$ . **SFP7** que tiene un fenotipo atenuado y cuyo cambio puntual se localiza en la base 482 (G 482 A) con un LD 50 de  $7.5 \times 10^6$  (**Cuadro I**).

Para determinar el efecto de estas mutaciones en la RNT 5' sobre su funcionalidad, se hicieron curvas de crecimiento de estas cepas virales en las líneas celulares HeLa y SK-N-SH (neuroblastoma humano) (La Monica, 1989).

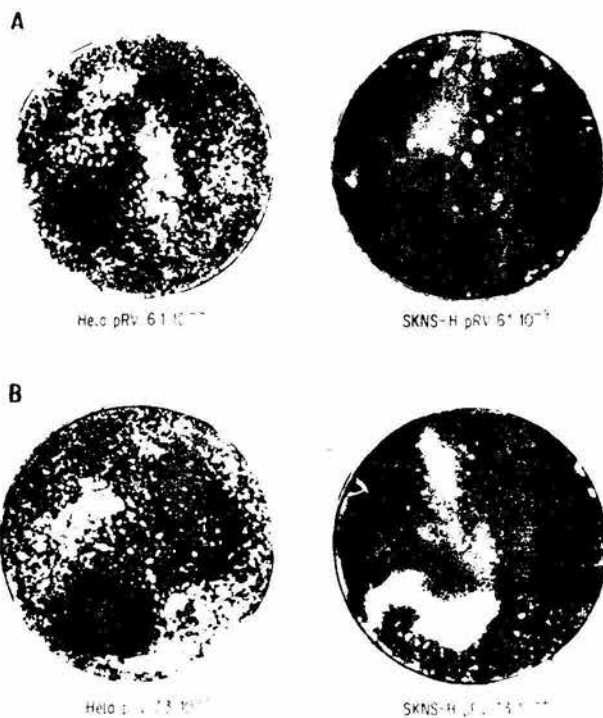
Previó a la realización de dichas curvas se decidió plaquear todas las cepas virales en ambas líneas celulares con la finalidad de corroborar los fenotipos obtenidos en los experimentos in vivo (**Cuadro I**). Se ha observado que el tamaño de placas da indicios de la capacidad replicativa de poliovirus en diferentes líneas celulares (Agol, 1991; Andino, 1990; Bienkowska, 1988; Kuge, 1987; Eustafieva, 1990).

Las placas obtenidas en HeLa y SK-N-SH del virus PRV 6.1 fueron

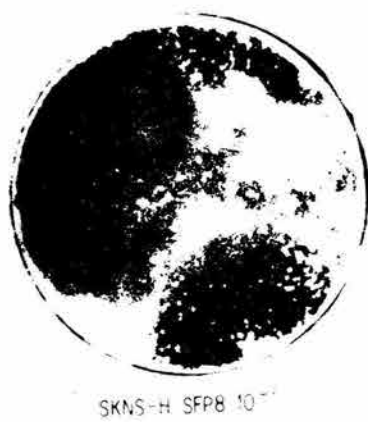
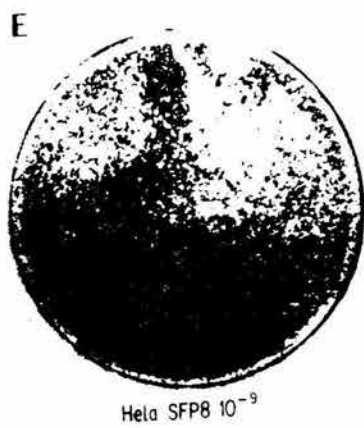
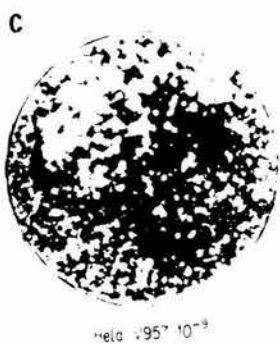
## CUADRO COMPARATIVO DE LA RNT 5' DE DIFERENTES CEPAS DE POLIOVIRUS

	220	472	482	529	LD <sub>50</sub>	Fenotipo
pRV 6.1	G	C	G	C	$<6 \times 10^2$	Virulento
pRV 7.3	U	U	G	C	$2 \times 10^7$	Atenuado
V957	G	C	A	U	$5.5 \times 10^4$	Virulento
SFP8	G	U	A	C	$1.6 \times 10^8$	Atenuado
SFP7	G	C	A	C	$7.5 \times 10^6$	Atenuado

**CUADRO I.-CUADRO COMPARATIVO DE LA RNT 5' DE DIFERENTES CEPAS DE POLIOVIRUS.** Los cambios puntuales presentes en su RNT 5' de las 5 cepas de virus empleados se encuentra encerrados en un cuadro. El fenotipo de cada una de las cepas se obtuvo por ensayos de neurovirulencia en ratón (Tomado de Skinner, et.al, 1989) (LD<sub>50</sub> es la cantidad de virus requerida para causar parálisis ó muerte del 50% de ratones inoculados).



**Figura 8.-** PLAQUEO VIRAL EN CELULAS HeLa Y SK-N-SH CON LOS VIRUS PRV 6.1, PRV 7.3, V957, SFP8 Y SFP7. Se infectaron las líneas celulares HeLa y SK-N-SH con los virus 6.1(A), 7.3(B), V957(C), SFP7(D), SFP8(E) dejándose adsorber 45 min a temperatura ambiente. Las células se incubaron por 48 hrs con DMEM 5% suero y 1% bactoagar a 37°C. Las células infectadas fueron fijadas con TCA al 20% y teñidas con cristal violeta. Después se obtuvo el número y tamaño de placas para cada virus en cada línea celular.



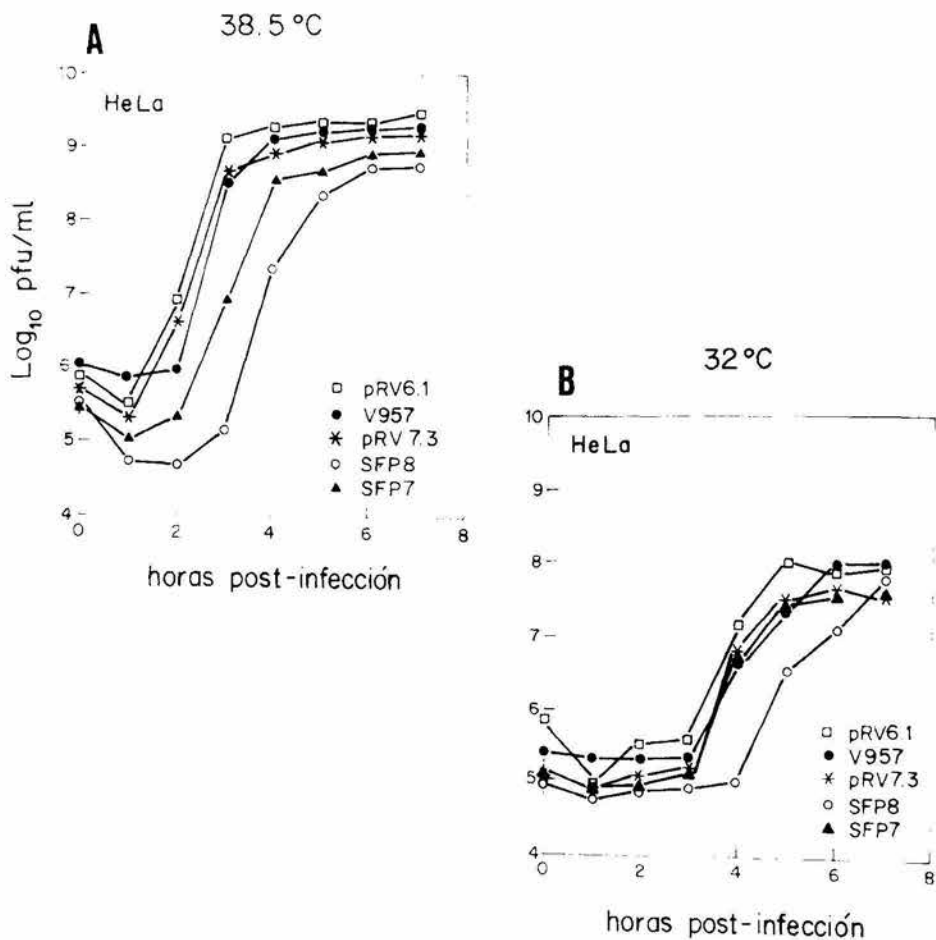
más grandes en esta última línea celular comparada con las observadas en células HeLa (**Fig. 8A**) a la misma dilución viral.

Para la cepa PRV 7,3 (P3/Sabin) se observaron placas pequeñas en ambas líneas celulares, con una ligera reducción en su número sobre todo en las células SK-N-SH (**Fig. 8B**). En el caso de la revertante neurovirulenta V957 se observó aproximadamente el mismo número y tamaño de placas que las producidas por el virus silvestre PRV 6.1 en células SK-N-SH, sin embargo el tamaño de placas obtenidas en HeLa con el revertante fueron ligeramente más grandes que con el virus silvestre PRV 6.1 (**Fig. 8C**). Con el virus SFP7 (**Fig. 8D**) hubo una diferencia muy marcada en cuanto al tamaño y número de placas obtenidas tanto en células HeLa como SK-N-SH. Las placas en SK-N-SH fueron en número 10 veces menor con respecto a las obtenidas en HeLa. En el caso del doble mutante atenuado SFP8 (**Fig. 8E**) se observó que en células HeLa el número de placas fue alto aunque de un tamaño menor comparado al virus silvestre. En células SK-N-SH aunque las placas fueron de mayor tamaño el número fue menor.

#### **PRODUCCION VIRAL EN CELULAS HeLa Y SK-N-SH.**

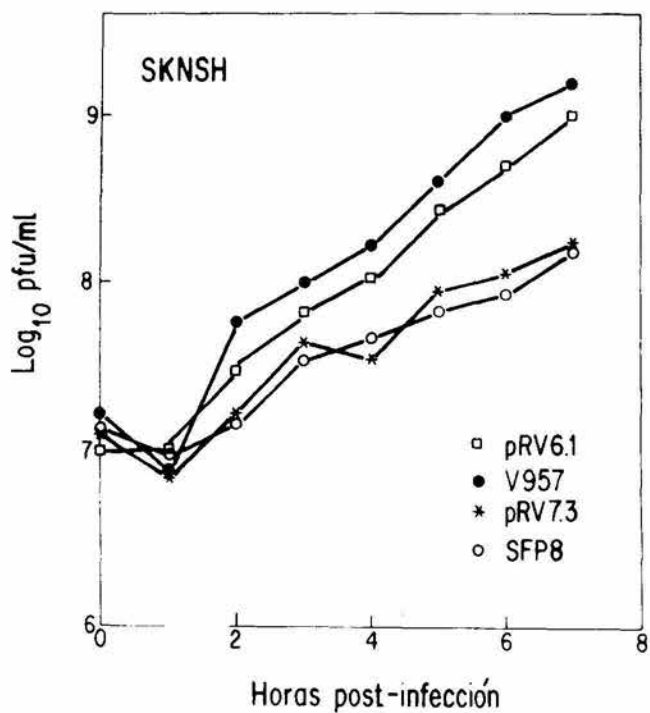
Una vez determinado el comportamiento de las 5 cepas virales en cuanto a su tamaño de placas, se realizaron las curvas de crecimiento, en el caso de células HeLa a dos temperaturas 32°C y 38.5°C y en células SK-N-SH a 37°C. Obteniéndose en HeLa a 38.5°C una baja producción viral en las cepas SFP8 y SFP7, lo cual indica una deficiente replicación viral de estos virus que contienen cambios en las bases 472 y 482. Mientras que en el resto de las cepas no se observaron diferencias considerables en cuanto a su replicación.

Resultados similares se obtuvieron cuando el experimento se realizó a 32°C, siendo menos drámatica la diferencia, entre ellos (**Fig. 9 A y B**). En lo que se refiere a células SK-N-SH se observó una replicación deficiente de los virus SFP8 y PRV 7.3 comparada con los virus PRV 6.1 y V957 (**Fig. 10**) como ya se ha reportado previamente (La Monica, 1987, 1989). Al parecer la mutación en la posición 472 altera la replicación viral en tejido neural



**Figura 9.- CURVA DE CRECIMIENTO DE VIRUS EN CELULAS HeLa INFECTADAS A DOS DIFERENTES TEMPERATURAS.** Se infectaron células HeLa con 10 pfu/cel con las cepas virales PRV 6.1□, PRV 7.3 \*, V957●, SFP7▲ y SFP8○. Se permitió la adsorción durante 45 min y después fueron mantenidos 38.5°C (A) ó 32°C (B). Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (de 0-7 hrs) y se determinó el título viral como se describe en Materiales y Métodos.





**Figura 10.-** CURVA DE CRECIMIENTO DE VIRUS EN CELULAS SK-N-SH. Se infectaron células SK-N-SH con 10 pfu/cel de los virus PRV 6.1 □ PRV 7.3 \*, SFP8 ○ y V957 ● durante 8 Hrs continuas, tomándose alícuotas cada hora. Los virus recuperados se usaron para infectar células HeLa y determinar el título viral por plaqueo.

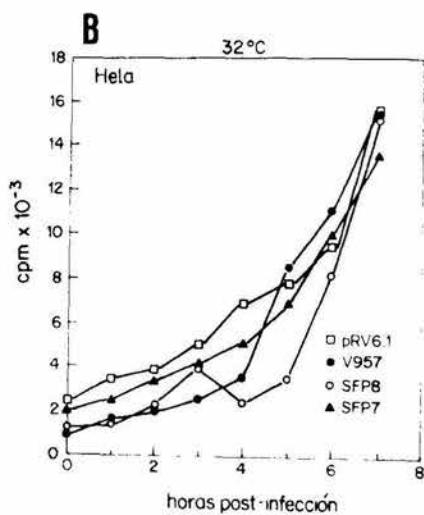
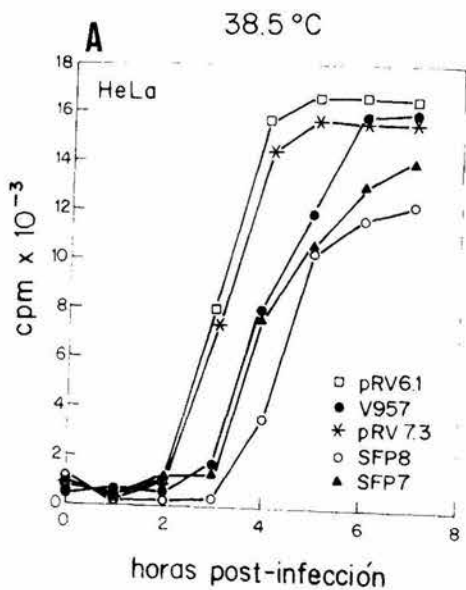
haciendola menos eficiente. Estos datos sugieren la participación de algún componente celular del huésped que se encuentre ausente, modificado ó en concentración diferente entre ambas líneas celulares y que sea responsable de la expresión diferencial del virus PRV 7.3 y SFP8 (La Monica, 1987).

#### **REPLICACION VIRAL EN HeLa Y SK-N-SH.**

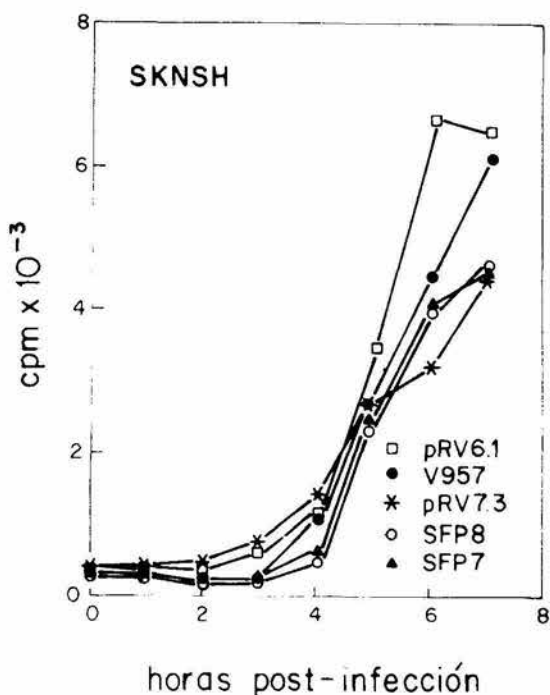
Para una primera aproximación de posibles alteraciones a nivel de replicación viral en las cepas analizadas, se realizaron las cinéticas de síntesis de RNA viral en ambas líneas celulares a las temperaturas antes indicadas. El RNA total citoplásmico obtenido de células infectadas a los diferentes tiempos de la cinética (7 hrs) se fijaron a filtros de nitrocelulosa y se hibridaron con una sonda de RNA (-) de la región que codifica para la proteína de cápside VP2. La cantidad de sonda unida fue determinada por cpm en un contador de centelleo. En células HeLa a 38.5°C se observó deficiente la replicación en SFP8 y SFP7 y ligeramente deficiente en el revertante neurovirulento V957 a tiempos tempranos de la cinética de infección (**Fig. 11**) incrementandose los niveles replicativos de esta última cepa a las 4 hrs post-infección. El virus PRV 7.3 no mostró diferencia en su eficiencia de replicación, comparada con la cepa silvestre PRV 6.1 como ya había sido reportado previamente (La Monica, 1989). En cuanto a la cinética realizada a 32°C (**Fig. 11**) no se observaron diferencias drásticas en replicación de los virus atenuados (SFP8, SFP7) en relación a los virus virulentos (PRV 6.1 y V957).

Ahora bien, en células SK-N-SH, tanto SFP8, SFP7 y PRV 7.3 produjeron bajos niveles de RNA en relación al virus silvestre PRV 6.1, y el revertante neurovirulento V957 (**Fig. 12**). No observandose diferencias significativas entre estas dos últimas cepas virales.

Anteriormente se había reportado que la replicación de PRV 7.3 era deficiente en líneas celulares de origen neural (La Monica, 1989) y que tal deficiencia esta unida a la presencia de un Uracilo en la posición 472.



**Figura 11.- SINTESIS DE RNA VIRAL EN CELULAS HeLa INFECTADAS A 38.5°C Y 32°C CON LOS VIRUS PRV 6.1, PRV 7.3, V957, SFP7 Y SFP8.** Se infectaron células HeLa como se describe en materiales y métodos y se tomaron alícuotas cada hora durante 7 hrs. El RNA total se extrajo y se cuantificó como se describe en materiales y métodos.



**Figura 12.-** SINTESIS DE RNA VIRAL EN CELULAS SK-N-SH INFECTADAS CON LAS CEPAS PRV 6.1, PRV 7.3, V957, SFP7 Y SFP8 A 37°C. Se infectaron células SK-N-SH como se describe en materiales y métodos y se tomaron alícuotas cada hora durante 7 hrs. El RNA total se extrajo y se cuantificó como se describe en materiales y métodos.

#### SINTESIS DE PROTEINAS VIRALES EN HeLa Y SK-N-SH.

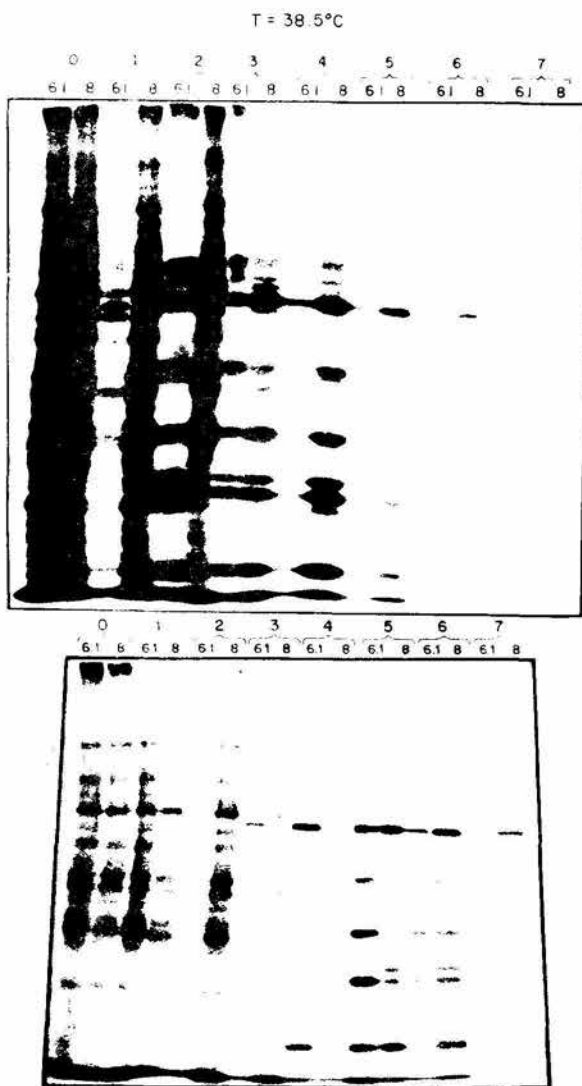
Como ya se mencionó, las deficiencias en la replicación de los virus analizados, a este nivel, se deben a los cambios puntuales en su RNT 5'. Algunas otras mutantes con variaciones en esta región han sido deficientes en replicación por una deficiencia inicial en la síntesis de proteínas; por lo que se realizaron cinéticas de síntesis de proteínas tanto en células HeLa como células SK-N-SH.

Las células infectadas fueron marcadas con Met S<sup>35</sup> a diferentes tiempos de infección, analizándose los extractos protéicos en geles de poliacrilamida-SDS.

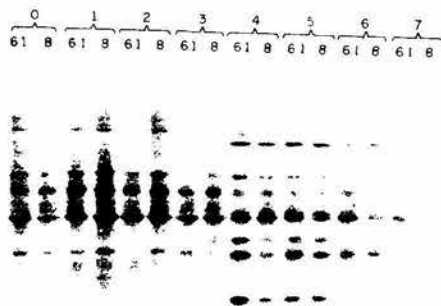
Los resultados obtenidos en células HeLa a 38.5°C para el virus SFP8, mostraron una deficiencia en la síntesis de proteína viral la cual se inicia a las 4-5 hrs post-infección en lugar de a las 2-3 hrs post-infección como se observa para el virus silvestre PRV 6.1.

Mas aún, la cantidad de proteína viral sintetizada por el SFP8 fue menor en todos los tiempos de la infección con respecto al virus PRV 6.1. Resultados similares se obtuvieron a 32°C con esta mutante (Fig. 13), aunque la alteración no fue tan drástica, pues la inhibición de proteínas celulares ocurrió de 1 a 2 hrs después que en el silvestre. Para los ensayos de traducción de esta mutante en SK-N-SH (Fig. 14) se observó un desfase de una hora entre el inicio de la traducción entre ambos virus, así mismo una reducción de la proteína viral sintetizada en todos los tiempos de infección.

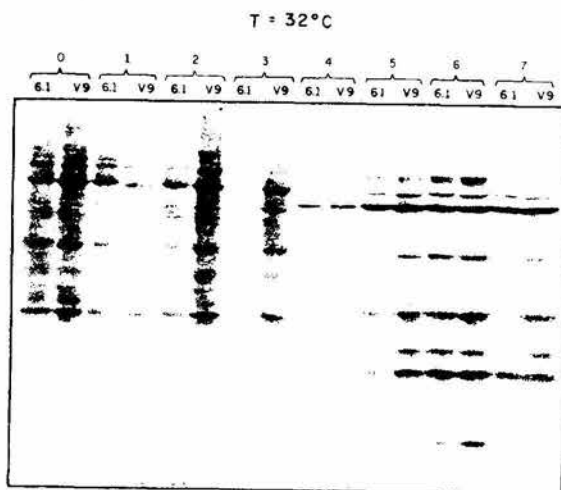
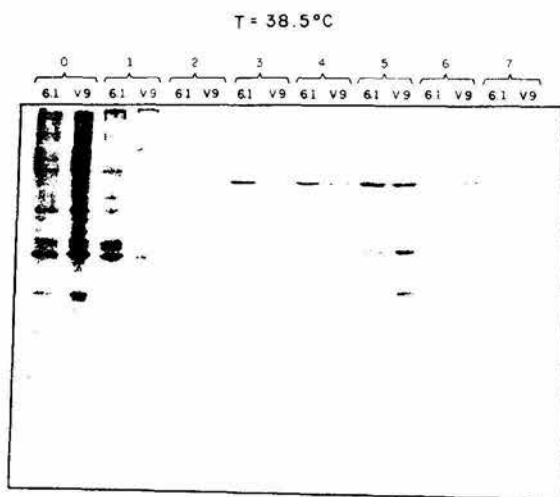
La síntesis de proteína viral observada para la revertante neurovirulenta V957 a 38.5°C en células HeLa, también disminuyó aunque de manera menos dramática que la observada en el virus SFP8, iniciándose a las 4 hrs post-infección en lugar de las 3 hrs observadas para el virus silvestre (Fig. 15). A las 5 hrs. post-infección se observó la misma cantidad de proteína para ambos virus. Sin embargo a 32°C esta revertante neurovirulenta resultó ser tan eficiente como el PRV 6.1 para traducirse, lo cual sugiere que tanto el doble mutante SFP8 y el revertante neurovirulento V957 son termosensibles a 38.5°C. En células SK-N-SH se observó una



**Figura 13.-** AUTORRADIOGRAFIA DE LA SINTESIS DE PROTEINAS EN HeLa INFECTADAS CON LOS VIRUS PRV 6.1 Y SFP8. Se infectaron células HeLa a 32°C y 38.5°C con 10 pfu de los virus PRV 6.1 (6.1) y SFP8 (8). Se tomaron las células cada hora (entre 0 y 7) y se incubaron con Met S<sup>35</sup> por 15 min como se describe en materiales y métodos. Los extractos protéicos se analizaron en gele de poliacrílamida-SDS al 10%. Los tiempos de infección se indican en la parte superior de la fotografía.

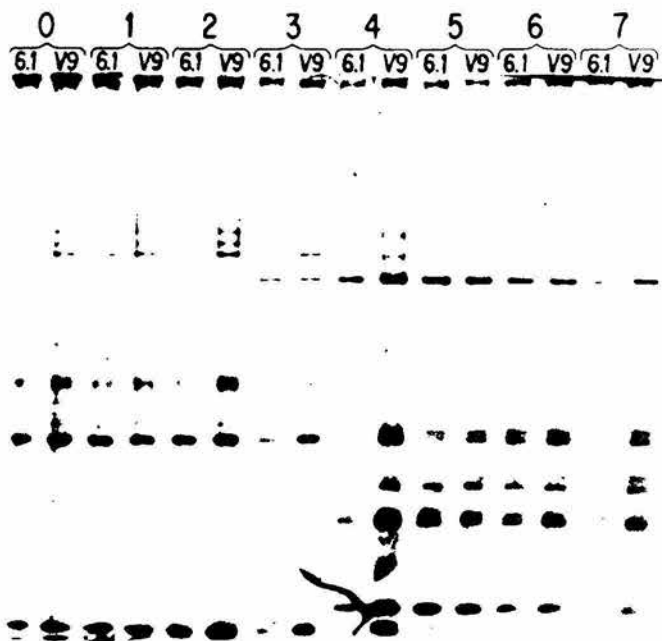


**Figura 14.-** AUTORRADIOGRAFIA DE LA SINTESIS DE PROTEINAS EN CELULAS SK-N-SH INFECTADAS CON LOS VIRUS PRV 6.1 Y SFP8. Se infectaron células SK-N-SH con los virus PRV 6.1 (6) y SFP8 (8). Se tomaron las células cada hora (entre 0 y 7) y se incubaron con Met S<sup>35</sup> por 30 min como se describe en materiales y métodos. Los extractos protéicos obtenidos se analizaron en gele de poliacrilamida-SDS al 10%. Los tiempos de infección se indican en la parte superior de la fotografía.



**Figura 15.-** AUTORRADIOGRAFIA DE LA SINTESIS DE PROTEINAS EN CELULAS HeLa INFECTADAS CON LOS VIRUS PRV 6.1 Y V957. Se infectaron células HeLa a 32°C y 38.5°C con 10 pfu de los virus PRV 6.1 (6.1) y V957 (V9). Se tomaron las células cada hora (entre 0 y 7) y se incubaron con Met S<sup>35</sup> por 15 min como se describe en materiales y métodos. Los extractos protéicos se analizaron en geles de poliácridamida-SDS al 10%. Los tiempos de infección se indican en la parte superior de la fotografía.





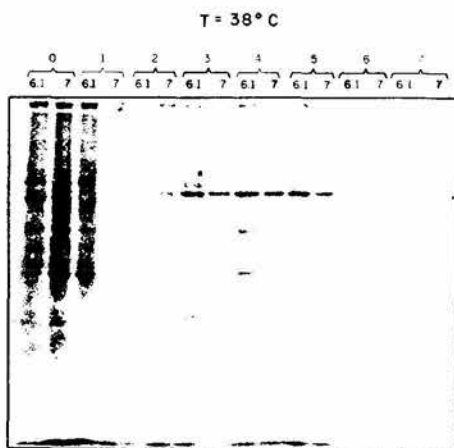
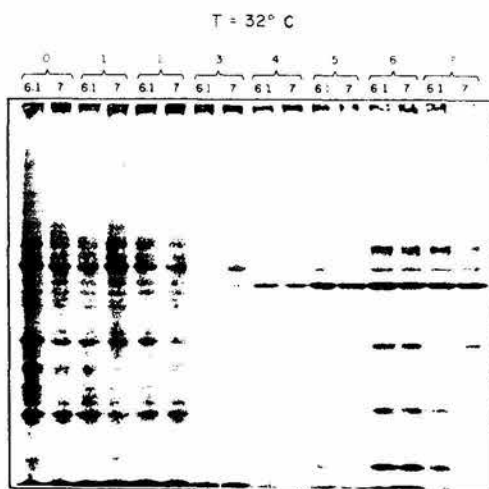
**Figura 16.-** SINTESIS DE PROTEINAS OBTENIDAS EN CELULAS SK-N-SH INFECTADAS CON LOS VIRUS PRV 6.1 Y V957 A DIFERENTES TIEMPOS DE INFECCION. Se infectaron células SK-N-SH con los virus PRV 6.1 (6) y V957 (V9). Se tomaron las células cada hora (entre 0 y 7) y se incubaron con Met  $S^{35}$  por 30 min como se describe en materiales y métodos. Los extractos protéicos obtenidos se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. Los tiempos de infección se indican en la parte superior de la fotografía.

síntesis de proteína viral similar entre la revertante y la cepa silvestre (Fig. 16) con un ligero desfase en el inicio (3 hrs.)

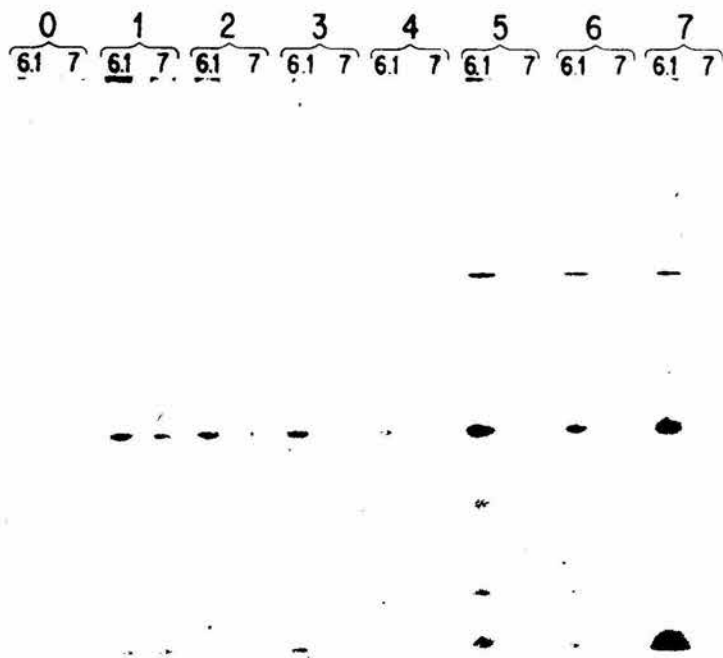
En cuanto a los resultados obtenidos para la mutante SFP7 en células HeLa a ambas temperaturas no se observaron diferencias con respecto al silvestre PRV 6.1 a 32°C pero sí a 38.5°C donde el virus mutante SFP7 produce una menor cantidad de proteína que el virus silvestre a todos los tiempos (Fig. 17). En células SK-N-SH, la inhibición de la síntesis proteica celular ocurrió a las 3 hrs post-infección, observándose la presencia de proteínas virales en ambos virus. Sin embargo a las 4 hrs post-infección se observó una considerable disminución de la traducción viral en el mutante SFP7 viéndose totalmente abatida a las 5 hrs, mientras que en el PRV 6.1 no se vió alteración alguna de éstas a lo largo de la cinética (Fig. 18). Lo anterior sugiere que la traducción deficiente de la cepa SFP7 en SK-N-SH, debe estar asociada a la mutación puntual presente en ella (G 482 A). En cuanto a la cepa PRV 7.3 P3/Sabin, los ensayos de traducción fueron realizados por La Monica (1987,1989) observando una deficiente traducción viral así como una deficiente replicación en células SK-N-SH y no así en células HeLa.

#### **OBTENCION DE VIRUS MUTANTES POR MUTAGENESIS DIRIGIDA.**

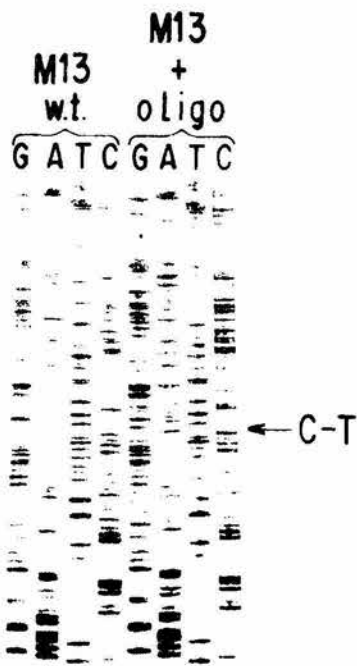
Una vez caracterizadas las cepas virales anteriores y de observar el efecto de los cambios puntuales en la RNT 5' de cada una de estas cepas en cuanto a replicación y traducción, se decidió generar mutaciones puntuales en el cDNA de la RNT 5' de poliovirus tipo 3 (Cepa León) la cual esta clonada en el fago M13 como ya se describió en materiales y métodos. Se siguió el protocolo de mutagénesis dirigida (ver materiales y métodos) para generar las mutaciones en esta región, utilizando oligos específicos que llevaban el cambio puntual en la posición de interés (472, 482 y 529). Se realizó la alineación de los oligos como se detalló en metodología y se obtuvieron los fagos recombinantes que fueron secuenciados (Fig. 19); se determinó que la mutagénesis no se llevó



**Figura 17.-** AUTORRADIOGRAFIA DE LA SINTESIS DE PROTEINAS EN HeLa INFECTADAS CON LOS VIRUS PRV 6.1 Y SFP7. Se infectaron células HeLa a 32°C y 38.5°C con 10 pfu de los virus PRV 6.1 (6.1) y SFP7 (7). Se tomaron las células cada hora (entre 0 y 7) y se incubaron con Met S<sup>35</sup> por 15 min como se describe en materiales y métodos. Los extractos protéicos se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. Los tiempos de infección se indican en la parte superior de la fotografía.



**Figura 18.-** AUTORRADIOGRAFIA DE LA SINTESIS DE PROTEINAS EN CELULAS SK-N-SH INFECTADAS CON LOS VIRUS pRV 6.1 Y SFP7. Se infectaron células SK-N-SH con los virus PRV 6.1 (6.1) y SFP7 (7) Se tomaron las células cada hora (entre 0 y 7) y se incubaron con Met S<sup>35</sup> por 30 min como se describe en materiales y métodos. Los extractos protéicos obtenidos se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. Los tiempos de infección se indican en la parte superior de la fotografía.

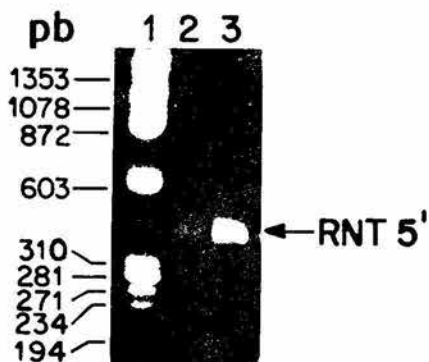


**Figura 19.-** SECUENCIACION DEL cDNA DE LA RNT 5' DE POLIOVIRUS TIPO 3 (CEPA LEON) CLONADA EN EL FAGO M13. Se realizó la mutagénesis dirigida en el fago M13 como se describió en materiales y métodos y se secuenciaron los fagos doble cadena por el método de Sanger (Sanger, 1977).

a cabo, pues todos los candidatos aislados y secuenciados permanecieron silvestres.

Por lo cual, se decidió seguir una metodología alternativa, la cual consistió en purificar el RNA viral de la revertante neurovirulenta V957 a partir de células HeLa infectadas. Una vez obtenido el RNA viral se sintetizó el cDNA mediante transcriptasa reversa, el cual a su vez sirvió como molde para amplificar por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) el fragmento correspondiente a la RNT 5' (Fig. 20) mediante la utilización de dos oligos (18 y 37) que poseen secuencias de la RNT 5' del cDNA de la cepa León.

Con el cDNA de la cepa revertante obtenido por este método, contamos ya con todos los cDNA de los virus estudiados, con el fin de caracterizarlos a nivel molecular en cuanto a su interacción con factores celulares de las dos líneas.



- 1- $\phi$ X174 RF/Hae III  
 2-Dil. 1/10 RNT 5' ampl.  
 3-RNT 5' amplificada (389nt)

**Figura 20.** PRODUCTOS DE PCR CORRESPONDIENTES A LA RNT 5' DE LA CEPA LEON. Se purificó el RNA viral de la revertante V957 y se utilizó como templado para la obtención del cDNA por transcriptasa reversa amplificándose el fragmento correspondiente a la RNT 5' por PCR. En el carril 1 se muestra el fago  $\phi$  X 174 cortado con Hae III como marcador de peso molecular; carril 2 dilución 1/10 de la mezcla de amplificación; carril 3 RNT 5' (389 nt) amplificada.

## DISCUSION

El fenotipo de atenuación ó virulencia del virus de la poliomiелitis ha sido uno de los aspectos más estudiados en los últimos años (Agol, 1988, 1989; Almond, 1987; Evans, 1985; Kawamura, 1989; Kuge, 1987; La Monica, 1987, 1989, Macadam, 1993)

El análisis de la secuencia primaria del RNA de cepas atenuadas y sus contrapartes virulentas, ha sido una de las herramientas más utilizadas para determinar las regiones directamente involucradas con el fenotipo. Dentro de la RNT 5' de poliovirus se ha encontrado que las posiciones 480, 481 y 472 de poliovirus tipo 1, 2 y 3 respectivamente constituyen los determinantes principales de neurovirulencia (Kawamura, 1989; Minor, 1988; Evans, 1985; Westrop, 1986) ya que cambios puntuales en estos nucleótidos modifican dramáticamente la neurovirulencia, tanto en monos como en ratones "in vivo" así como en células nerviosas "in vitro". Estos nucleótidos se localizan en una región conocida como el dominio VI de la RNT 5' formando parte de una estructura de tallo, de la cual se presume que su desestabilización, resultado de las mutaciones, reduce la eficiencia de traducción viral de manera célula específica ya que solamente en células nerviosas se ha podido observar este proceso (Agol, 1989; La Monica, 1987, 1989) y no así en células HeLa.

Con el fin de aportar más conocimientos respecto a las bases moleculares de la atenuación y neurovirulencia, estudiamos la capacidad de replicación de algunas cepas virales con cambios de una ó dos bases dentro de la región VI de la RNT 5', dentro de células HeLa y células de origen nervioso (SK-N-SH).

Las curvas de crecimiento obtenidas en este trabajo, muestran que tanto a 38.5°C como a 32°C la producción viral fue un logaritmo menor con los virus SFP8 y SFP7 comparada con los virus PRV 6.1 y V957. Esta diferencia fue menos dramática a 32°C. Sin embargo, el virus PRV 7.3 mostró una replicación deficiente en células nerviosas y no así en células HeLa. La deficiencia observada en la capacidad de propagación se ha correlacionado también con el tamaño



de placas líticas producidas por el virus en cuestión. Así, en SK-N-SH los virus atenuados (SFP8 y PRV 7.3) produjeron placas pequeñas mientras que los virus PRV 6.1 y V957 placas grandes; dando evidencias de que la generación de placas grandes se relaciona con una buena replicación viral y placas pequeñas, con deficiencias a este nivel. En células HeLa las placas pequeñas solo fueron producidas por SFP8. Debido a que la replicación y la traducción son procesos altamente relacionados, decidimos analizarlos de manera separada.

Los resultados, muestran que los virus SFP8 y SFP7 tienen una replicación deficiente a 38.5°C en células HeLa a tiempos tempranos de la infección, igual que en SK-N-SH. El virus V957 que se replica al mismo nivel que el PRV 6.1 en células nerviosas, presenta una ligera reducción en la velocidad de replicación a tiempos tempranos de la infección en células HeLa. Debido a que la replicación viral es un fenómeno posterior a la síntesis de proteínas, se estudió la capacidad de traducción de estos virus. En células HeLa a 38.5°C el virus SFP8 mostró una reducción en la síntesis de proteína viral en relación con el PRV 6.1, no habiendo una diferencia muy marcada entre éste y el virus atenuado SFP7. En células nerviosas la traducción fue deficiente para la cepa vacunal PRV 7.3 y los virus atenuados SFP8 y SFP7, no mostrando diferencia entre los virus V957 y PRV 6.1.

Estos datos apoyan la idea de que la modificación en la base 472 es un determinante mayor de neurovirulencia, dado que afectan la síntesis de proteína viral y concomitantemente la replicación y propagación del virus en células nerviosas. Las cepas con cambios C 472 U como PRV7.3, y SFP8 fueron atenuados y deficientes en traducción y replicación en células nerviosas, y al parecer, la modificación en una base adicional dentro de este dominio (G 482 A), puede repercutir en la desestabilización de la supuesta estructura secundaria pudiendo extender el defecto traduccional de las cepas en células nerviosas (SFP7) y hacia células HeLa (SFP8).

La hipótesis de que la desestabilización de la estructura secundaria pueda, de alguna manera determinar una reducción en las

capacidades replicativas del virus, se ve reforzada por los resultados obtenidos con la revertante neurovirulenta V957. Esta cepa fue obtenida de cerebros de ratones inoculados con la doble mutante atenuada SFP8. La cepa V957 recuperó la virulencia, restableciendo la paridad y la estructura secundaria propuesta para el dominio VI, lo cual explica su fenotipo neurovirulento, pues su capacidad traduccional y de replicación tanto en células HeLa como de neuroblastoma se hacen comparables a la de la cepa silvestre.

El hecho de que mutaciones puntuales como la de PRV 7.3 en la base 472 puedan influir de manera diferencial en distintos tipos celulares, sugiere que factores de las células huésped participan en la replicación viral.

Esta bien documentado que la RNT 5', y en específico el dominio VI, es una zona blanco para la unión de factores proteicos celulares que participan en la traducción cap-independiente (Pelletier, 1988; Del Angel, 1989; Sonenberg, 1989; Jackson, 1990; Pestova, 1991; Dildine y Semler, 1992; Gebhard, 1992; Meerovitch, 1993). Algunos factores celulares implicados en la interacción descritos hasta el momento son la proteína pPTB, La, p97, eIF-2 etc. (Del Angel, 1989; Meerovitch, 1989, 1993; Pestova, 1991; Jang y Wimmer, 1990; Gebhard, 1994).

En específico, el sitio de unión de la pPTB se ha localizado en el dominio VI y al parecer la interacción de RNA-proteína requiere de una determinada estructura secundaria y no tanto así de secuencia primaria. A pesar de que PTB es una proteína que participa en procesamiento de pre mRNA en el núcleo de células eucarióticas (García-Blanco, 1989), es claro que también participa de manera importante en la traducción cap-independiente (Hellen y Wimmer, 1993). Si las mutaciones que describimos en este trabajo alteran la interacción de PTB con esta región (dominio VI), sería sencillo poder explicar la deficiencia en síntesis de proteínas virales. El que un virus se traduzca de manera poco eficiente traería como consecuencia que a su vez sintetizara menos cantidad de replicasa viral que es la enzima viral involucrada en la síntesis de nuevas cadenas de RNA, por tanto generaría virus con

una replicación reducida como se observó con las cepas atenuadas analizadas. Tanto la traducción como la replicación reducidas traerían finalmente cepas atenuadas.

Otra pregunta importante que se desprende de lo mencionado anteriormente y de este estudio es: ¿ Existen factores que participan en la traducción cap-independiente, tejido específico ?. Algunos factores de traducción como eIF-2 presentan diversos grados de fosforilación en diferentes líneas celulares (Del Angel, 1989) otros, como el mRNA para PTB sufre procesamiento que puede traer como consecuencia una diferencia en la cantidad de moléculas capaces de unirse eficientemente al IRES de poliovirus en diferentes líneas celulares.

Adicionalmente, otros factores que participan en la traducción cap-independiente como La, no se ha encontrado en ciertos sistemas como el de reticulocito de conejo (Meerovitch y Sonenberg, 1993) en donde poliovirus es incapaz de traducirse.

Todo lo anterior sugiere que la presencia, ausencia ó concentración diferencial de factores celulares en líneas ó tejidos, puede ser un factor determinante en el proceso de traducción cap-independiente y neurovirulencia. Por lo tanto es muy importante estudiar todos estos procesos, para entender los mecanismos que se llevan a cabo en la regulación de la traducción y que nos permitan conocer más claramente los fenómenos de atenuación y virulencia.

## CONCLUSIONES.

A partir de todos los resultados obtenidos en el presente trabajo llegamos a las siguientes conclusiones.

- Cambios en las bases 472 y 482 probablemente modifican de manera drástica la estructura secundaria de la RNT 5', reduciendo la eficiencia de traducción tanto en células nerviosas como en células HeLa.

- El restablecimiento de la estructura secundaria en el dominio VI corrige la deficiencia en la síntesis de proteínas, como se observó con la revertante V957.

- La deficiencia en la síntesis de proteína viral es la causa del fenotipo atenuado observado para varias cepas de poliovirus.

- La estructura secundaria más que la secuencia primaria del dominio VI de la RNT 5', parece influir de manera determinante en la traducción viral.

De la misma manera nuestros resultados nos permiten sugerir que:

- Los cambios puntuales presentes en la RNT 5' de las cepas virales analizadas, evidenciaron comportamientos distintos en las líneas celulares utilizadas (HeLa y SK-N-SH), lo que hace suponer la existencia de una interacción diferencial entre los factores celulares y la RNT 5' de estas cepas.

## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Agol, V.I. 1988. Genetic determinants of neurovirulence and attenuation of poliovirus. *Mol.Genet. Mikrobiol.Virusol.* 1,3-9.
- Agol, V.I.et.al, 1989. Restricted growth of attenuated poliovirus strains in culture cells of a human neuroblastoma. *J.Virol.* 63: 4034-38.
- Agol, V.I. 1991. The 5-untranslated region of picornaviral genomes. *Adv in Virus Res* 40: 103-80.
- Almond, J.W. 1987. The attenuation of poliovirus Neurovirulence. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 153-80.
- Anderson-Sillman, K. et.al, 1984. Guanidine-resistant poliovirus mutants produce modified 37-Kilodalton proteins. *J.Virol.*50: 922-928.
- Andino,R. et.al, 1990. Substitutions in the protease ( 3C<sup>pro</sup> ) gene of poliovirus can suppress a mutation in the 5' noncoding region. *J. Virol.* 64 (2): 607-612.
- Andino, R. et.al, 1990. A functional ribonucleoprotein complex forms around de 5' end of poliovirus RNA. *Cell.* 63: 369-80.
- Armstrong, J.A. et.al, 1972. *Science* 176: 526-528.
- Baltimore, D. 1971. Expression of animal virus genomes. *Bacteriological Reviews.*35: 235-241.
- Bienkowska-Sczewczyk, K. and Enrehfeld, E. 1988. An internal 5' noncoding region requerid for translation of poliovirus RNA in vitro. *J. Virol.* 62: 3068-72.
- Borman, M.A., Deliat, G.F., Kean,M.K. 1994. Sequences within the poliovirus internal ribosome entry segment control viral RNA synthesis. *EMBO. J.*13 (13): 3149-3157.
- Cajero, J.M. 1991. Importancia de la Región No Traducida 5' ( RNT 5' ) en la atenuación del virus de la poliomieltis (poliovirus). Tesis- licenciatura. ENEP-Iztacala. UNAM. México.
- Cajero, J.M. 1992. Asociación de proteínas celulares a la RNT 5' de Rhinovirus humano 14. Tesis- maestría. CINVESTAV-IPN. México.
- Candelario, M.A. 1986. Análisis de proteínas nucleares y citoplasmáticas en células HeLa infectadas con el virus de la poliomieltis en base a su afinidad por DNA. Tesis- licenciatura. ENEP-Iztacala. UNAM. México.

- Cooper, P.D. et.al, 1978. Picornaviridae: Second report Intervirology 10: 165-180.
- Crawford, N.M. and Baltimore, D. 1983. Genome linked-protein VPg of poliovirus in present as free VPg and VPg-pUpU in poliovirus infected cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 7432-7455.
- Dasgupta, A. et.al, 1980. Dependence of the activity of the poliovirus replicase on a host cell protein. Cell 19: 423-29.
- Del Angel, R.M. et.al, 1989. Cell proteins bind to multiple sites within the 5' untranslated region of poliovirus RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 8299-303.
- Del Angel, R.M. 1990. Influencia de la RNT 5' en la traducción del RNAm de Poliovirus. Tesis-Doctorado. CINVESTAV-IPN. México.
- Dildine, S.L. and Semler, B.L. 1989. The deletion of 41 proximal nucleotides reverts a poliovirus mutant containing a temperature-sensitive lesion in the 5' noncoding region of genomic RNA. J. Virol. 63: 847-862.
- Dildine, S.L. et.al, 1991. Poliovirus translation initiation. Differential effects of directed and selected mutations in the 5' noncoding region of viral RNA's. Virology 182: 742-52.
- Dildine, S.L. and Semler, B.L. 1992. Conservation of RNA- Protein interactions among picornaviruses. J. Virol. 66:4364-4376.
- Detjen, B.M.; Lucas, J. and Wimmer, E. 1978. Poliovirus single-stranded RNA and double-stranded RNA : differential infectivity in enucleate cells. J. Virol. 27: 582-586.
- Dorner, A.J. et.al, 1982. Identification of the initiation site of poliovirus polyprotein synthesis. J. Virol 42: 1017-28.
- Emini, E.A. et.al, 1982. Carboxy-terminal. Analisis of poliovirus proteins termination of poliovirus RNA translation and location of unique poliovirus polyprotein cleavage sites. J. Virol 42: 194
- Ehrenfeld, E. 1984. Picornavirus inhibition of host cell protein synthesis . Comprehensive Virology. Vol.19. New York. Plenum Press. 177-221.
- Ehrenfeld, E. 1994. Interaction of cellular proteins with the poliovirus 5' noncoding region. Arch. Virol. ( suppl) 9: 269-277.
- Etchinson, D. et.al, 1982. Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 200,000-dalton polypeptide associated with eucaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. J. Biol. Chem. 257:14806-10.

- Eustafieva, A.G. et al, 1990. A complex RNA sequence determines the internal initiation of encephalomyocarditis virus RNA translation. *Nucleic Acids Res.* 19: 665-71.
- Evans, D.M.A. et al, 1985. Increased Neurovirulence associated with a single nucleotide change in a noncoding region of the Sabin type 3 poliovaccine genome. *Nature.* ( London ) 314: 548-50.
- Fernandez-Tomas, C. and Baltimore, D. 1973. Morphogenesis of poliovirus. II. Demonstration of a new intermediate the poliovirion. *J. Virol.* 12: 1122-1130.
- Fenner, F.; and White, D.D. 1972. *Medical Virology.* Academic Press. New York. pp 2659-277.
- Fields, N. B; Knipe, M.D. 1990. *Virology.* Chapter 1,5,10,20. Second edition. Raven Press. New York.
- Flanagan, J.B. et al, 1977. Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNA's of poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 961-965.
- García-Blanco, M.A. 1989. Identification and purification of a 62,000- dalton protein that binds specifically to the polypyrimidine tract of introns. *Genes Dev.* September 27.
- Gebhart, J.R. and Ehrenfeld, E. 1992. Specific interactions of HeLa cell proteins with proposed translation domains of the poliovirus 5' noncoding region. *J. Virol.* 66: 3101-9.
- Goodheart, C. 1969. *Replication of viruses that contain RNA en: An introduction of Virology.* W.B. Saunders Company. N.Y. 199-226.
- Hambidge, S.J. 1992. Translational enhancement of the poliovirus 5' noncoding region mediated by virus-encoded polypeptide 2A. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 89:10272-76.
- Hashimoto, I. et al, 1984. *Acta Neuropathol.* ( Berlín ) 64:53-60.
- Hellen CUT, 1 et. al. 1992. Determinants of substrate recognition by poliovirus 2A proteinase. *J. Virol.* 66: 3330-38.
- Hellen CUT, et. al. 1993. A cytoplasmic 57-kDa protein that is required for translation of picornavirus RNA by internal ribosomal entry is identical to the nuclear pyrimidine tract-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 7642-7646
- Haller, A.A. 1992. Linker scanning mutagenesis of the internal ribosome entry site of poliovirus RNA. *J. Virol.* 66:5075-5086.

- Jackson, R. J. et. al. 1990. The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. Trends Biochem Sci. 15: 477-483.
- Jang, S.K. et.al. 1988. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. J.Virol. 62: 2636-2643.
- Jole, J. et.al, 1988. Poliovirus protein 3CD is the active protease for processing of the precursor protein P1 in vitro. J.Gen.Virol 69: 1627-36.
- Johnson, V.H. and Semler, B.L. 1988. Defined recombinants of poliovirus and coxsackievirus: Sequence- specific deletions and functional substitution in the 5' noncoding region of viral RNAs. Virology. 162: 47-57.
- Kawamura, N. et.al, 1989. Determinants in the 5' noncoding region of poliovirus Sabin 1 RNA that influence the Attenuation phenotype. J. Virol 63 (3): 1302-1309.
- Kitamura, N. et.al, 1981. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. Nature. ( London ). 291: 547-553.
- Koch, F; and Koch, G. 1985. The Molecular Biology of poliovirus. Springer, Verlag. Berlin.
- Kuge, S. and Nomoto, A. 1987. Construction of viable deletion and Insertion mutants of the Sabin strain of type 1 poliovirus: Function of the 5' noncoding sequence in viral replication. J.Virol 61: 1478-87.
- La Monica, N. et.al, 1986. Mapping of sequence required for mouse neurovirulence of poliovirus type 2 Lansing. J. Virol. 57: 515-525.
- La Monica, N.; Almond, J.; Racaniello, V. 1987. A mouse model for poliovirus neurovirulence identifies mutations that attenuate the virus for humans. J. Virol 61: 2917-20.
- La Monica, N.; Racaniello, V. 1989. Differences in replication of attenuated and neurovirulent poliovirus in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. J.Virol. 63: 2357-60
- Larsen, G.R. et.al, 1981. Stable Hairpin structure within the 5' terminal 85 nucleotides of poliovirus RNA. J.Virol 37: 328-35.
- Larsen, G.L. et al, 1982. Cleavage sites within the poliovirus capsid protein precursors. J. Virol 41: 340-44



- Lee CK, Wimmer. E. 1988. Proteolytic processing of poliovirus polyproteins: Elimination of 2A<sup>pro</sup>- mediated, alternative cleavage of polypeptide 3CD by in vitro mutagenesis. *Virology*.166:405-14.
- Levintow, L. 1974. *Comprehensive Virology 2*:Plenum Press. New York. 109-55.
- Luria, D.S. et.al, 1978. *General Virology*. Ed. Jhon Wiley & Sons. USA.
- Macadam, J.A. et.al, 1993. Genetic Basis of attenuation of the Sabin type 2 vaccine strain of poliovirus in primates. *Virology*. 192: 18-26.
- Matthews, F.E. 1982. Classification and nomenclature of viruses. 4° report of the international committee on taxonomy of viruses. Ed. Kerger.
- Melnick, L.J. 1976. *Viral infections of human; Enteroviruses*. Ed. Plenum Medical. pp. 163-261.
- Mendelson, G.; Wimmer,E.; Racaniello,V. 1989. *Cell*.
- Meerovitch, K. and Sonenberg, N. 1993. Internal Initiation of Picornavirus RNA translation. *Seminars in Virology*.4:217-227.
- Meerovitch, K. et.al. 1991. In vitro mutational analysis of cis-acting RNA translational elements within the poliovirus type 2 5' untranslated region. *J.Virol*. 65:5895-5901.
- Meerovitch, K.; Pelletier, J.; Sonenberg, N. 1989. A cellular protein that binds to the 5'- noncoding region of poliovirus RNA: implications for internal translation initiation. *Gene Dev*.3:1026-1034.
- Minor, D.P. et. al. 1993. Genetic basis of attenuation of the Sabin type 2 vaccine strain of poliovirus in primates. *Virology*.192: 18-26.
- Moss, E.G. et.al,1989. Mapping of attenuating sequences of an avirulent poliovirus type 2 strain. *J.Virol*. 63:1884-90.
- Nair,C.N. 1981. Monovalent cation metabolis and cytopathics effects of poliovirus infected HeLa cells. *J. Virol* 37: 268-73
- Nicklin, M.J.H. et.al, 1986. Proteolitic Proccesing in the replication of polio and related viruses. *Bio/Technology*. 4:33-42.
- Nicholson, R. 1991. Structural and functional analysis of the ribosome landing pad of poliovirus: in vivo translational studies. *J. Virol*. 65:5886-5894.

- Nomoto, A. et.al, 1981. Comparative sequence Analysis of the 5'-terminal noncoding regions of poliovirus vaccine strain Sabin 1, Sabin 2, and Sabin 3 genomes. *Virology*. 113: 54-63.
- Nomoto, A. ; Wimmer, E. 1987. Genetic studies of the antigenicity and attenuation phenotype of poliovirus. *Soc.Gen.Microbiol.Symp.* 40, 107-134.
- Omata, T. et.al, 1986. Genetic Analysis of the attenuation phenotype of poliovirus type 1. *J. Virol.* 58: 348-358.
- Pallasch, M.A. et.al, 1984. Protein processing map of poliovirus. *J. Virol.* 49 (3): 873-80.
- Pelletier, J. et.al, 1988. Cap- independent translation of poliovirus mRNA is conferred sequence elements within the 5'-noncoding region. *Mol. Cell. Biol.* 8(3):11030-1112.
- Pelletier, J. and Sonenberg, N. 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by sequence derived from poliovirus RNA. *Nature.*( London). 334: 320-325.
- Pestova, T.V. et.al, 1991. Translation of poliovirus RNA: role of an essential cis-acting oligopyrimidine element within the 5' non translated region and involvement of a cellular 57-KDa protein. *J.Virol.* 65:6194-6204.
- Pilipenko, E.V. 1992. Prokaryotic-like cis-elements in the cap-independent internal initiation of translation on picornavirus RNA. *Cell.* 68: 119-131.
- Pizarro-Suarez, E. 1971. *Los Virus. Monografía no.8. Serie de Biología. OEA. Washington.D.C.*
- Poyry, T. et. al, 1992. Genetic variation in vivo and proposed functional domains of the 5' noncoding region of poliovirus RNA. *J.Virol.* 66: 5313-19
- Racaniello, V.R. and Baltimore, D. 1981. Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete sequence of the viral genomes. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 78: 4887-4891.
- Racaniello, V.R. and Meriam, C. 1986. Poliovirus temperature sensitive mutant containing a single nucleotide deletion in the 5' noncoding region of the viral RNA. *Virology.* 155: 498-507.
- Racaniello, V.R. 1988. Poliovirus Neurovirulence. *Adv. in virus Research. Academic Press USA.* 34: 217-46.
- Rekosh, K.M.D. 1977. *The molecular Biology of Picornavirus. The Molecular Biology of animal viruses. Vol 1. Marcel. Dekker. Inc. New York.* pp. 63-110.

- Rivera, V.M. et.al, 1988. Comparative sequence. Analysis of the 5'-noncoding region of the Enteroviruses and Rhinoviruses. *Virology*.165: 42-50.
- Rueckert, R.R. 1985. Picornaviruses and their replication. In *Virology*. ( BN. Fields, ed. ) Raven, N.Y. pp. 705-738.
- Schmid, N. and Wimmer, E. 1994. IRES- controlled protein synthesis and genome replication of poliovirus. *Arch. of Virol.* Springer- Verlag. Austria. suppl(9): 279-289.
- Skinner, A.M. et.al. 1989. New model for the secondary structure of the 5' non-coding RNA of poliovirus is supported by biochemical and genetic data that also show that RNA secondary structure is important in neurovirulence. *J.Mol.Biol.* 207:379-392.
- Spector, D.H. and Baltimore, D. 1974. Requireriment of 3'-terminus poly ( adenylic acid ) for the infectivity of poliovirus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71: 2983-2987.
- Sonenberg, N. 1987. Regulation of translation by Poliovirus. *Adv in Virus Res.* 33: 175-205.
- Sonenberg, N. and Pelletier, J. 1989. Poliovirus translation: A paradigm for a novel initiation mechanism . *Bioessay* 11: 128-132.
- Svitkin, Y.V. et.al, 1985. The genomes of attenuated and virulent poliovirus strain differ in their " in vitro " translation efficiencies. *Virology.* 147: 243-252.
- Svitkin, Y. et.al, 1988. Point mutations modify the response of poliovirus RNA to a translation initiation factor: a comparison of neurovirulent and attenuated strains.*Virology*.166:394-404
- Svitkin, Y. et.al, 1990. Translation deficiency of the Sabin type 3 poliovirus genome: association with an attenuating mutation C<sub>472</sub>-U. *Virology.* 175:103-9.
- Takeda, N. et.al, 1986. Initiation of poliovirus Plus- stranded RNA synthesis in membrane complex of infected HeLa cells. *J. Virol* 60: 43-53.
- Tapia, R.J. 1990. Estudio de funciones virales supresoras en poliovirus. Tesis- Doctorado. CINVESTAV-IPN. México.
- Toyoda, H. et.al, 1984. Complete nucleotide sequence of all three poliovirus serotype genomes. Implication for genetic relationship, gene function and antigenic determinants. *J. Mol. Biol.* 174: 561-585

- Trono, D.; Andino, R. 1988a. An RNA sequence of Hundreds of nucleotide at the 5' end poliovirus RNA is involved in allowing viral protein synthesis. *J. Virol* 62.(7): 2291-2299.
- Trono, D. et.al, 1988b. Translation in mammalian cells of a gene linked to the poliovirus 5' noncoding region. *Science*.241.445-448.
- Westrop, G.D. et. al, 1989. Genetic basis of attenuation of the Sabin type 3 oral poliovirus vaccine. *J.Virol*.63:1338-1344.
- Willingmann, P. et.al, 1989. Recovery of structuraly in fact and infectious poliovirus type 1 from HeLa during receptor-mediated endocytosis. *Virology*. 168: 417-420.
- Wimmer, E. 1982. Genome-linked proteins of viruses. *Cell*.28:199-201.
- Wimmer, E. 1993. Genetics of poliovirus. *Annu.Rev.Genet*.27:353-436
- Wimmer, E.; Nomoto, A. 1993. Molecular Biology and Cell-Free synthesis of poliovirus . *J. of the International Association of Biological Standarization*. 21: 349-356