

1 Ej.  
3

# COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL  
Y DE POSGRADO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ESTUDIO DE LOS POLIPEPTIDOS ESTRUCTURALES

DEL ROTAVIRUS DE SIMIO SA 11

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A

SUSANA LOPEZ CHARRETON

1 9 8 0



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## INDICE

	Pag.
<u>INTRODUCCION</u>	1
- Antecedentes	1
- Morfología	3
- Composición	4
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	7
- Virus	7
- Cultivo de células	7
- Purificación del virus	8
- Electroforesis en gel de Poliacrilamida	9
- Tratamiento de las partículas virales con tripsina	10
- Hidrólisis parcial de los polipéptidos de SA 11	10
- Mapas trípticos de los polipéptidos de SA 11	11
- Tratamiento del virus con EDTA	12
- Tratamiento del virus con endoglicosidasa H	13
<u>RESULTADOS</u>	14
- Efecto de la tripsina sobre el SA 11	15
- Comparación de los polipéptidos VP3, VP5 y VP8 por hidrólisis parcial y total	16
- Estudio de las proteínas glicosiladas	17
- Distribución de los polipéptidos en la capa externa y en la capa interna del virus	19
<u>DISCUSION</u>	21
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	27
<u>AGRADECIMIENTOS</u>	

## INTRODUCCION

Los primeros reportes de un agente viral capaz de producir -- diarreas infantiles datan de 1941-42 cuando Light y Hodes estudiando ca-- sos de diarrea en un hospital de Baltimore encontraron que podían repro-- ducir una enfermedad similar en becerros recién nacidos al inocular oral-- mente filtrados fecales de niños con diarrea (1). Sin embargo, aunque su trabajo fue repetido posteriormente, los virus presentes en los filtrados no eran capaces de multiplicarse en las líneas celulares establecidas, o en animales experimentales y el trabajo no se continuó.

Posteriormente, en 1958, se observó que ratones jóvenes pre-- sentaban también, un tipo de diarrea no bacteriana. Kraft (2) estableció que el agente causal era un virus y por estudios de microscopía electróni-- ca se mostró que tenía un diámetro de 80 nm; y que se multiplicaba en las células epiteliales del intestino delgado. Lo llamó virus EDIM (Epizootic Diarrhea of Infant Mice).

En 1969 Mebus et al. (3) reportaron la producción experimen-- tal de diarrea al inocular intraduodenalmente u oralmente filtrados feca-- les libres de bacterias en becerros deprivados de calostro. Este trabajo recibió poca atención hasta que el rotavirus humano fue descubierto (o -- redescubierto) en 1973, al hacer exámenes microscópicos de biopsias duode-- nales de niños que presentaban gastroenteritis agudas no bacterianas. -- Estos estudios revelaron la presencia de partículas "parecidas" a los --

orbivirus dentro de las células epiteliales de la mucosa duodenal (4-7), y la relevancia de los trabajos anteriores con el virus EDIM y el virus de la diarrea de terneros fue inmediatamente reconocida.

Estas partículas virales parecidas a los orbivirus y a los reovirus fueron detectadas posteriormente también en heces de un gran número de especies animales que presentaban diarrea y se sugirió que estos virus se incluyeran en un nuevo género dentro de la familia Reoviridae, con el nombre de duovirus (8) o rotavirus (6).

Los reportes de infecciones por rotavirus en humanos, indican una incidencia mundial de estos virus (4, 5 y 9). Se han encontrado además, rotavirus en heces de lechones (10 y 11), corderos (12 y 13), aves de corral (14), conejos (15), venados (16 y 17), caballos (14), ratones (2) y becerros (3 y 18). También son incluidos en este grupo de los rotavirus, el virus SA 11 aislado de un lavado rectal de mono y el agente "O" obtenido de lavados intestinales de ovinos y bovinos. Aunque ambos virus no fueron detectados como agentes causales de diarrea, son morfológicamente idénticos (19).

Las infecciones por rotavirus ocurren generalmente en animales jóvenes. En humanos las infecciones por rotavirus, especialmente aquellas lo suficientemente serias para requerir hospitalización, ocurre en el grupo de niños de 6 meses a 2 años y el pico de incidencia en climas templados es en invierno (7, 20 y 21). En la Ciudad de México, la mayor incidencia se observa en los meses de otoño (22, 23). Las diarreas

por rotavirus en humanos representan del 10 al 40% de los casos de gastroenteritis presentes en este grupo (20-25).

Estudios sobre la patogénesis de las infecciones por rotavirus en humanos (7,26) y en animales experimentales (27,28) sugieren que estas infecciones no son sistémicas sino localizadas en las células epiteliales de la mucosa del duodeno en el intestino delgado.

Se ha hecho un gran esfuerzo por adaptar los rotavirus obtenidos de animales y humanos infectados a crecer en líneas celulares. Varios aislados, entre ellos los del rotavirus de ternera (NCDV) y el SA 11 han sido exitosamente propagados en cultivo de tejidos (18,29). Recientemente se ha logrado crecer en cultivo de células un virus aislado de humanos (cepa Wa) por un grupo de NIH (67), y se ha observado que para una propagación eficiente es importante el uso de enzimas proteolíticas pancreáticas (30).

#### Morfología

Las partículas intactas del rotavirus están formadas por una doble cápside. Al microscopio electrónico se observa un "core" de aproximadamente 38 nm de diámetro (31) en forma de un icosaedro, que contiene el genoma del virus en asociación con proteínas; este "core" está rodeado por una cápside interna que presenta una línea basal de la que radian proyecciones a la periferia que semejan los rayos de una rueda (de ahí el nombre rotavirus, rota = rueda) y que dan a las partículas un diámetro de

65 nm (32). Sobre estos capsómeros internos se encuentra una segunda cápside semejante a un anillo liso con un ancho de 4 a 5 nm, por lo que las partículas completas tienen un diámetro de aproximadamente 80 nm (33, -- Fig. 1).

Frecuentemente se encuentran partículas virales de 65 nm que han perdido la capa externa (6,34). Estas partículas también se pueden obtener de partículas completas, mediante la disociación de la capa externa con EDTA (35). Las partículas con o sin capa externa difieren en su densidad por lo que pueden ser separadas por centrifugación isopícnica en gradientes de CsCl (36). Las partículas sin capa externa "pesadas" son más densas ( $\rho = 1.38 - 1.39 \text{ g/cm}^3$ ) que las partículas completas "livianas" ( $\rho = 1.36 \text{ g/cm}^3$ ). Parece ser que sólo son infecciosas las partículas completas (37).

#### Composición

El genoma de los rotavirus consiste en 11 segmentos de RNA - de doble cadena separables electroforéticamente (38-40), cuyos pesos moleculares van de  $2.2 \times 10^6$  a  $0.2 \times 10^6$  aproximadamente (41). La suma de los pesos moleculares de los segmentos de RNA del genoma de los rotavirus da un total de  $11-12 \times 10^6$ .

Muchos autores han analizado por electroforesis los polipéptidos estructurales de los rotavirus, obtenidos, ya sea de muestras de heces de diferentes especies animales o de células en cultivo infectadas



Figura 1. Micrografía electrónica de una preparación de rotavirus SA 11. Señalada con una flecha se observa una partícula con cápside externa.

(41-51). Estos trabajos han dado distintos resultados con respecto al número de polipéptidos (de 5 a 10) en las partículas virales, de su concentración relativa y de su peso molecular.

En el rotavirus SA 11 purificado de cultivos de células infectadas se han descrito 8 (42,43), 9 (48,49) ó 10 (44) diferentes polipéptidos. Sin embargo todos estos reportes coinciden en la existencia de al menos 8 polipéptidos, designados VP1, VP2, VP3, VP4, VP5, VP6, VP7 y VP8 por Rodger et al. (48).

En el cuadro 1, se puede ver un resumen de los polipéptidos reportados por distintos autores para el rotavirus SA 11, usando el sistema de geles de Laemmli (54), los estimados de peso molecular, las designaciones empleadas y su posible correspondencia.

Teniendo específicamente para carbohidratos las proteínas virales separadas electroforéticamente, se ha encontrado que el polipéptido VP7 está glicosilado (48).

Dada la discordancia que existe en la literatura en cuanto a la composición de los polipéptidos estructurales y la composición relativa de éstos en el rotavirus de simio SA 11, y que estas proporciones varían aún de preparación a preparación de este virus (datos del laboratorio de R. Espejo), es posible pensar en la existencia de una relación precursor producto entre algunos de estos polipéptidos. Un ejemplo podría ser que existieran precursores no glicosilados o en distinto estado de glicosilación del polipéptido VP7 y esto se reflejara en la aparición

CUADRO 1

COMPARACION DE LA NOMENCLATURA Y PESOS MOLECULARES DE LOS POLIPEPTIDOS ESTRUCTURALES DE SA 11, DESCRITO POR VARIOS AUTORES UTILIZANDO EL SISTEMA DE BUFFER LAEMMLI

Smith <u>et al.</u> (49)		Mason <u>et al.</u> (44)		Espejo <u>et al.</u> (42)	
Polipéptido	Peso mol. (x 10 <sup>-3</sup> )	Polipéptido	Peso mol. (x 10 <sup>-3</sup> )	Polipéptido	Peso mol. (x 10 <sup>-3</sup> )
I <sub>1</sub>	130	VP1	125	1	125
I <sub>2</sub>	94	VP2	94	2	108
I <sub>3</sub>	88	VP3	88	3	98
I <sub>4</sub>	82	VP4	84	4	94
O <sub>1</sub>	62	VP5	62	5	68
--	--	VP5a	60	--	--
I <sub>5</sub>	42	VP6	41	6	37
O <sub>2</sub>	36	VP7	38	7	26
--	--	VP7a	36	-	--
O <sub>3</sub>	28	VP8	28	8	23
O <sub>4</sub>	26	---	--	--	--

de distintos patrones electroforéticos.

En este trabajo se pretende determinar el número de polipéptidos estructurales del virus, y establecer posibles relaciones entre ellos.

## MATERIAL Y METODOS

### Virus

El rotavirus de simio SA 11 (simian agent 11) adaptado a crecer en cultivo de células, se obtuvo originalmente del Dr. H. H. Malherbe de la Universidad de San Antonio Texas.

### Cultivo de Células

El rotavirus SA 11 se creció en una línea de células epiteliales de riñón de mono (MA 104). Las células fueron crecidas a 37°C y bajo 5% de CO<sub>2</sub> en medio mínimo esencial de Eagle (MEM) con 250 UI/ml de penicilina, 50 ug/ml de estreptomycinina y 10% de suero bovino fetal, como se ha descrito anteriormente (42). Se usó tripsina (Difco, 10 µg/ml final) -- únicamente durante el periodo de adsorción del virus a la célula 9 1 hr (63) en todas las preparaciones, a menos que se indique otra cosa.

Para preparar virus marcado radioactivamente, el MEM completo fue reemplazado 6 horas post-infección (p.i.) por MEM con bajo contenido de L-metionina (0.3 mg/l) y 33 µCi/ml de L-metionina <sup>35</sup>S (> 500 Ci/mmol, New England Nuclear Corp.) o reemplazado por MEM con 1/10 del contenido normal de todos los aminoácidos y 170 µCi/ml de una mezcla de aminoácidos <sup>3</sup>H (New England Nuclear Corp.). Para marcar el virus con carbohidratos radioactivos, el MEM completo se sustituyó 6 horas p.i. con MEM con un bajo contenido de glucosa (250 mg/l) y 500 µCi/ml ya sea de D-manosa <sup>3</sup>H o

o D-glucosamina  $^3\text{H}$  (ambas de 10-25 Ci/mmol, New England Nuclear Corp.). -  
El virus se cosechó aproximadamente 20 horas p.i.

Para eliminar la tripsina remanente y evitar que se cortaran algunos polipéptidos virales las células se lavaron 4 veces con PBS --- (0.136 M NaCl, 2 mM KCl, 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.9 mM  $\text{CaCl}_2$  y 0.4 mM  $\text{MgCl}_2$ ) después de la adsorción del virus en presencia de la enzima, y luego 3 veces más antes de la adición del medio radiactivo.

#### Purificación del Virus

El virus se purificó como está descrito (42) que consiste en lo siguiente: el cultivo de células infectadas, cosechado a las 20 hr. p.i., se extrae con un volumen igual de trifluorotricloroetano; y el virus en la fase acuosa se precipita posteriormente con 8% (peso/vol.) de polietilenglicol 600 (Union Carbide). El precipitado se resuspende en 100-200 ul de buffer TSM (0.01 M Tris indroximetil aminometano, 0.15 M NaCl y 0.001 M  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  pH 8.2) y se sedimenta en un gradiente lineal de 15-45% de sacarosa en TSM a 19,000 rpm durante 145 min en un rotor SW 40 de la ultracentrífuga Beckman mantenida a 5°C. Los gradientes se colectan, y se juntan las fracciones con el pico de radiactividad, correspondiente al virus.

Posteriormente el virus colectado se pone sobre una solución de CsCl en buffer TM (TSM sin NaCl) con una densidad de 1.36  $\text{g/cm}^3$  y se centrifuga a equilibrio durante 17 hr a 40,000 rpm en un rotor SW 50.1 de

la ultracentrífuga Beckman. Después de la centrifugación se colectan --  
fracciones de aproximadamente 150  $\mu$ l, se cuentan y aquellas que contienen  
el virus radiactivo se juntan y se dializan contra buffer TSM para quitar  
el CsCl.

Para evitar la acción de proteasas aún remanentes se siguieron  
los mismos pasos de purificación, pero manteniendo la preparación a ---  
0-5°C.

#### Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

Los polipéptidos virales se analizaron en geles de acrilami-  
da-SDS (11% peso/vol acrilamida, 0.3% peso/vol bisacrilamida) usando el -  
sistema discontinuo en buffer tris-glicina de Laemmli (54). Los polipép-  
tidos se corrieron a 10 mA/gel en el gel concentrador y la electroforesis  
se continuó a 20 mA/gel hasta que el azul de bromofenol salió del gel --  
separador.

Posteriormente los geles se tñeron con azul brillante de --  
Coomassie y se procesaron para fluorografía según lo descrito por Bonner y  
Laskey (55). Se hicieron las curvas densitométricas de los fluorogramas  
a 600 nm usando un espectrofotómetro Gilford modelo 250 con un transpor--  
tador lineal Gilford modelo 2410s.

### Tratamiento de las Partículas Virales con Tripsina

Los viriones purificados, marcados con metionina  $^{35}\text{S}$  o con -- mezcla de aminoácidos  $^3\text{H}$ , en buffer TSM, se trataron con cantidades variables de tripsina (tipo IX Sigma Chemical Co., tratada con cloruro de difenilcarbamilato para inactivar la quimotripsina contaminante) por 20 min a -25°C.

Estas reacciones se pararon añadiéndoles buffer para muestras de Laemmli (54) e hirviéndolas durante 2 min.

### Hidrólisis parcial de los Polipéptidos de SA 11

Se hizo un análisis de los péptidos generados por digestiones parciales de los polipéptidos de SA 11 utilizando quimotripsina (tipo II Sigma Chemical Co.) o proteasa V8 de Staphilococcus aureus (Miles Laboratories Inc.) como está descrito por Cleveland et al. (56). Este análisis consistió en lo siguiente: los polipéptidos estructurales de SA 11 purificados y marcados con aproximadamente  $1 \times 10^6$  cpm de metionina  $^{35}\text{S}$  fueron fraccionados en geles de poliacrilamida-SDS como se ha descrito anteriormente. Las bandas correspondientes a los polipéptidos fueron visualizadas por autorradiografía directa del gel húmedo. Los segmentos del gel, conteniendo las distintas bandas resultantes se colocaron en los carriles de un segundo gel (15% peso/vol acrilamida 0.4% peso/vol bisacrilamida) - con un gel concentrador de 5 cm y se cubrieron con una solución de 50  $\mu\text{g}$  de albúmina en buffer para muestra de Cleveland (56) enseguida se les añá

dió, ya sea 10 µg de quimotripsina o 100 µg de proteasa V8 en el mismo -  
buffer de muestra sin azul de bromofenol. La electroforesis se efectuó  
a 20 mG-gel hasta que el colorante llegó al gel separador; en este momen-  
to se quita la corriente durante 30 min permitiendo que se lleve a cabo  
la digestión (56) y posteriormente se corre a 40 mA-gel hasta que el azul  
de bromofenol sale del gel.

#### Mapas trípticos de los Polipéptidos de SA 11

Para hacer los mapas trípticos de los polipéptidos estructu-  
rales de SA 11 se siguió el mismo procedimiento de visualización y aisla-  
miento de las bandas ya descrito para el análisis de los hidrolizados par-  
ciales.

A los segmentos del gel se les añadió 10 ml de metanol al --  
10% vol/vol y se dejaron toda la noche a temperatura ambiente; después de  
quitar el exceso de metanol, se les añadió 200 µl de buffer bicarbonatos  
(0.5 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pH 8.0) y se incubaron por 16 hr a 37°C con una solución -  
de 100 µg de tripsina (tipo IX Sigma Chemical Co.); luego se les añadie--  
ron 100 µg más de tripsina fresca y se incubó 4 hr más como está descrito  
por Morrison (57): Se desechó el segmento de gel y la solución resultan-  
te se liofilizó dos veces lavando con agua, para eliminar el  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ .

El análisis de los péptidos en dos dimensiones se hizo como -  
está reportado por Scott et al. (51): la muestra liofilizada se disol--  
vió en 10 µl de agua y se aplicó en una placa de celulosa en capa fina --

(20 cm x 20 cm Merck). La electroforesis se hizo en una cámara horizontal, usando como buffer de corrida piridina:acético:agua (2:20:180) a -- 300 volts por 90 min. Para la separación de los péptidos en la segunda dimensión se corrió una cromatografía ascendente en dirección perpendi-- cular a la electroforesis usando como buffer de corrida n-butanol:acéti-- co:agua (3:1:1) hasta que el frente de corrimiento llegó a la parte supe-- rior de la placa. Las placas se trataron para fluorografía de acuerdo - con lo descrito (59).

#### Tratamiento del virus con EDTA

El virus SA 11 purificado, marcado con una mezcla de aa<sup>3</sup> H -- en buffer TSM se incubó con 0.01 M de EDTA (Etilen diamine tetraacetic - acid) y 0.01% vol/vol de Tritón X-100 durante 30 min a temperatura am--- biente como está descrito por Cohen (35). Posteriormente el virus trata-- do se centrifugó a equilibrio en CsCl como se describió anteriormente. Después de la centrifugación, los dos picos radioactivos correspondien-- tes a los polipéptidos de capa externa ( $\rho = 1.3 \text{ g/cm}^3$ ) y a las partícu-- las sin capa externa ( $\rho = 1.39 \text{ g/cm}^3$ ) se recolectaron separadamente, se diluyeron 1:5 en agua y se precipitaron con una solución de acetato de - amonio 0.1 M en etanol (60). Los precipitados se centrifugaron a --- 10,000 rpm durante 30 min en el rotor HB-4 de la centrífuga Sorvall y -- posteriormente se resuspendieron en el buffer para muestras de Lammli y se analizaron por electroforesis.

Tratamiento del virus con Endoglicosidasa H

El virus purificado, marcado ya sea con metionina  $^{35}\text{S}$  o con -  
carbohidratos  $^3\text{H}$  en buffer citrato fosfato (0.15 M pH 5), se trató con --  
diferentes concentraciones de endoglicosidasa H (Miles Laboratories Inc.)  
como está indicado en el pie de la figura 6H, durante 15 min a 37°C.

## RESULTADOS

Cuando los polipéptidos presentes en el rotavirus SA 11 purificado, obtenido de una infección hecha en presencia de tripsina, son -- analizados en un gel de poliacrilamida-SDS, se observa el patrón de la -- Fig. 2A y B. Este patrón es similar a los que han sido previamente re-- portados para SA 11 (42,43,49). Aunque no idénticos, coinciden en la -- existencia de cuando menos 8 polipéptidos estructurales diferentes VP1, VP2, VP3, VP4, VP5, VP6, VP7 y VP8. En este trabajo se empleará la no-- menclatura utilizada originalmente por Rodger et al. (48).

A pesar de que todos estos reportes coinciden en estos poli-- péptidos se observan ciertas incongruencias, principalmente en la propor-- ción relativa de éstos. Por esta razón, se decidió estudiar si existía alguna relación precursor producto entre los polipéptidos estructurales -- de SA 11 comparando los hidrolizados parciales de las proteínas VP1, VP2, VP3, VP5, VP6 y VP7 de un virus purificado y marcado con metionina <sup>35</sup>S -- como está indicado en Material y Métodos. En este estudio se observó que los péptidos generados por quimotripsina de las proteínas VP3 y VP5 pre-- sentaban un patrón bastante similar a diferencia del resto de los polipép-- tidos analizados, que no se parecían entre sí (resultados no presentados).

Para estudiar si la similitud del polipéptido VP5 con el po-- lipéptido VP3 se debía a que VP5 era generado de VP3 por un rompimiento -- de esta última durante la purificación, se siguió el mismo esquema de pu--

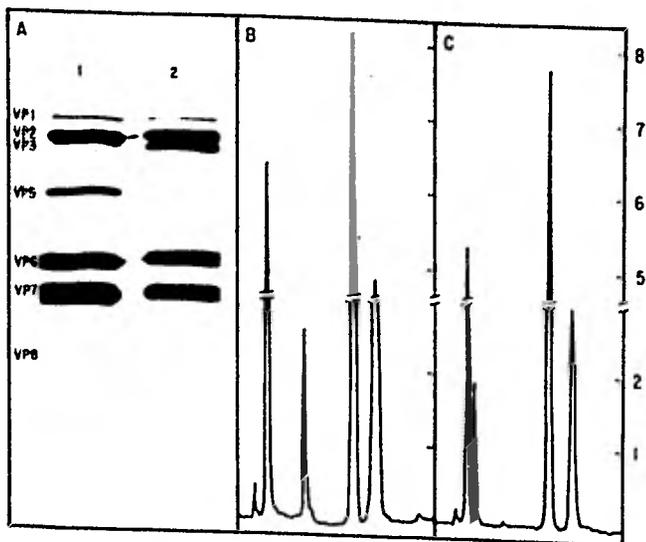


Figura 2. Comparación de los polipéptidos de SA 11 - purificado de distintas maneras. Virus marcado con -- metionina<sup>35</sup>A, purificado por los dos métodos descritos en material y métodos, se analizó por electroforesis. A) Fluorografía de los polipéptidos estructurales de SA 11 purificado a temperatura ambiente (carril 1) -- SA 11 purificado a 0-5°C (carril 2). B) y CO Trazos - densitométricos de las fluorografías de los carriles - 1 y 2 respectivamente.

rificación del virus, pero haciendo todo el procedimiento a baja temperatura (0-5°C). El virus obtenido en esta forma presentaba un patrón de polipéptidos en el que VP5 y VP8 apenas se distinguen, mientras que la cantidad relativa de un polipéptido mayor, probablemente VP3 estaba aumentada notablemente (Fig. 2A y C).

Este mismo patrón también se puede observar si el rotavirus SA 11 es obtenido de células lavadas exhaustivamente después de la infección hecha en presencia de tripsina o de células infectadas en ausencia de tripsina, sugiriendo que la diferencia se debía a la acción de la proteasa.

Ya que la suma de los pesos moleculares estimados para VP5 y VP8, (62,000 d y 28,000 d, respectivamente), es similar al peso molecular de VP3 (88,000 d) se estudió la posibilidad de que los polipéptidos VP5 y VP8 fuesen producto del rompimiento de VP3 por la acción de la tripsina.

#### Efecto de la Tripsina sobre el Virus SA 11

Para estudiar este efecto se utilizó un virus obtenido en condiciones en que existe una mayor cantidad relativa del polipéptido VP3 con respecto a VP5 y VP8 (ver Materiales y Métodos) y marcado ya sea como metionina  $^{35}\text{S}$  o con una mezcla de aminoácidos  $^3\text{H}$ . Este virus se sometió a concentraciones crecientes de tripsina purificada (tratada con un inhibidor específico para quimotripsina, que es el principal contaminante de la tripsina) y el producto de estas reacciones se analizó elec-

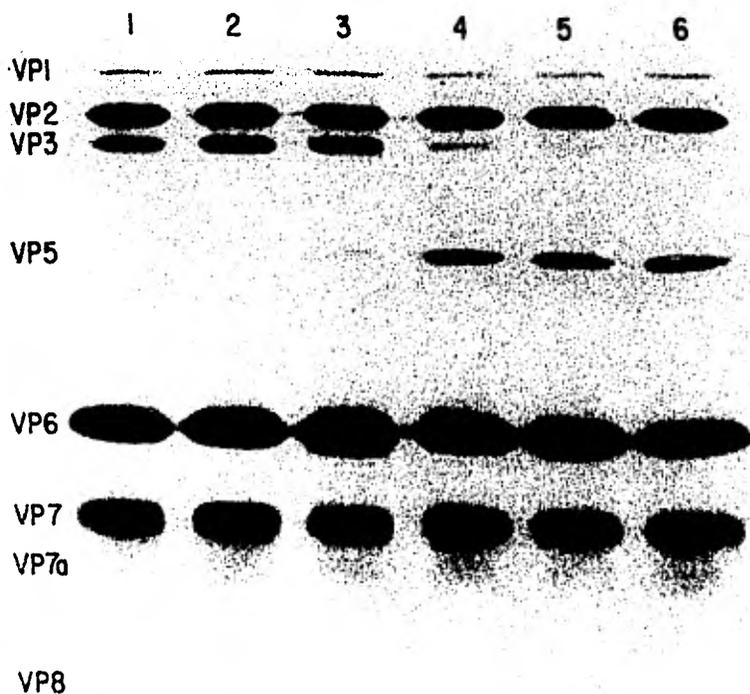


Figura 3. Efecto de tripsina sobre el virus SA 11 purificado. SA 11 purificado en condiciones en que hay una mayor cantidad de VP3 y marcado con metionina  $^{35}\text{S}$  fue tratado con diferentes concentraciones de tripsina (tratada con DECC por 20 min a 25°C): 1) sin tripsina, 2) 1 µg/ml; 3) 2 µg/ml; 4) 5 µg/ml; 5) 10 µg/ml y 6) 100 µg/ml. Posteriormente, las muestras tratadas se analizaron por electroforesis.

troforéticamente (Fig. 3). Los resultados obtenidos con concentraciones crecientes de tripsina sugieren una relación precursor-producto entre los polipéptidos VP3 y VP5 y VP8. El resto de los polipéptidos no son afectados por esta enzima.

Para explorar si este rompimiento específico de la proteína VP3 es debido a la exposición de un sitio de este polipéptido a la tripsina, dado por la estructura del virus, se disoció la cápside externa del virus, mediante el tratamiento con EDTA y esta preparación se incubó en presencia de tripsina. En estas condiciones se pierde la especificidad de corte del polipéptido VP3, no se observan los polipéptidos VP5 y VP8, los polipéptidos VP1, VP2, VP3 y VP7 desaparecen casi en su totalidad -- mientras aparecen nuevas bandas de menor peso molecular en el gel. (Datos no mostrados). Esto sugiere que el rompimiento específico de VP3 en VP5, se debe a la exposición de un sitio accesible a la tripsina en el polipéptido VP3, dado por la conformación de este polipéptido en la estructura del virus.

#### Comparación de los polipéptidos VP3, VP5, VP8 por hidrólisis parcial y -- total

Para confirmar la posible relación precursor-producto entre VP3 y VP5-VP8 se emplearon dos técnicas:

- a) Se compararon los péptidos de VP3, VP5 y VP8 generados por la -- digestión parcial con dos enzimas proteolíticas: quimiotripsina y proteasa V8 de Staphylococcus aureus (Fig. 4 A y B). La presencia de los productos parciales de VP3 en VP5 y en VP8 sugiere

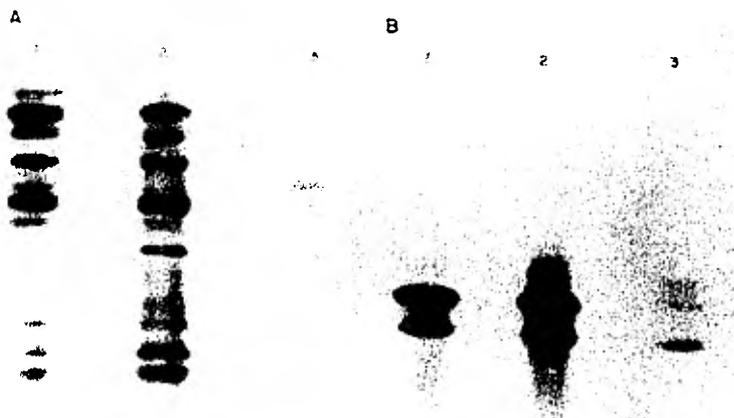


Figura 4. Comparación de los polipéptidos VP3, VP5, y VP8 de SA 11 por análisis de los patrones electroforéticos de los péptidos generados por hidrólisis con proteasas. El polipéptido VP3 fué obtenido de un virus no -- tratado con tripsina y marcado con metionina  $^{35}\text{S}$ ; VP5 y VP8 fueron aislados de un virus tratado con tripsina. A. 1) VP5, 2) VP3 y 3) VP8 tratado con tripsina. B. 1) VP5, 2) VP3 y 3) VP8 tratado con proteasa V8.

que estos últimos polipéptidos son generados a partir del primero. El hecho de que se encuentren bandas en VP3, que están - tanto en VP5 como en VP8, se debe probablemente a la presencia de más de un producto parcial en VP3 en el mismo peso molecular; uno (o más perteneciente a VP5 y el otro(s) a VP8. Los pocos -- productos parciales obtenidos en la hidrólisis del polipéptido - VP8, reflejan probablemente su bajo peso molecular, así como, su pobre contenido en metionina, ya que la radiactividad incorporada a este polipéptido cuando se marca con una mezcla de aminoácidos  $^3\text{H}$ , es sensiblemente mayor a cuando se hace con metionina --  $^{35}\text{S}$  (datos no mostrados).

- b) Se hizo comparación de los mapas tripticos de éstas proteínas - (Fingerprints), que consiste en hacer digestiones con tripsina del polipéptido aislado y luego separar los péptidos resultantes en dos dimensiones; la primera separación esta basada en las cargas de los péptidos a pH ácido (3.5) y la segunda en el coeficiente de partición de éstos en el solvente utilizado en el buffer de - corrida. En la Figura 5 se muestran los mapas tripticos de VP3, VP5, y VP8. Como se puede observar, los péptidos derivados de - VP5 están contenidos en los péptidos generados por las hidrólisis de VP3. Asimismo, en el mapa triptico de VP8 hay dos péptidos muy ténues (fotografía no mostrada) que se esquematizan en - la Figura 5 B y que se encuentran también en VP3. Estos resultados confirman que los polipéptidos VP5 y VP8 son productos de VP3.

#### Estudios de las Proteínas Glicosiladas

Como se mencionó en la introducción, ha sido reportado que el polipéptido VP7 está glicosilado. Cuando se hace una infección en presencia de glucosamina  $^3\text{H}$  o de manosa  $^3\text{H}$  se puede observar que el único poli-



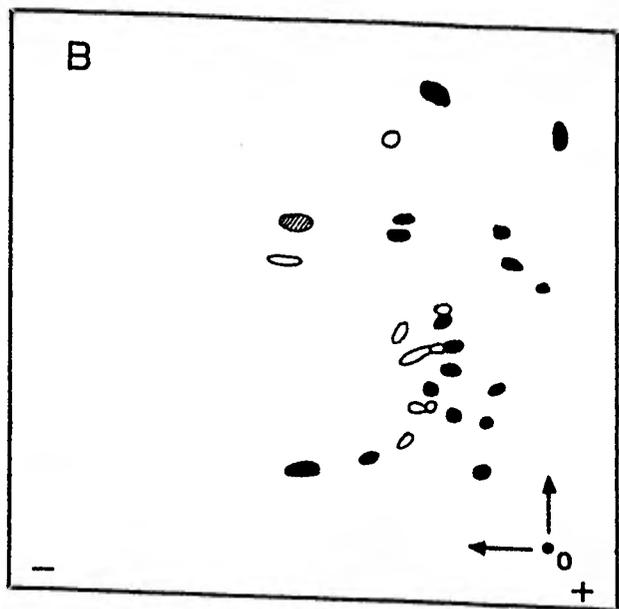


Figura 5. A) Mapas tripticos de los polipéptidos de SA 11. 1) VP3, 2) VP5. B) Diagrama de los mapas -- tripticos. ●. Péptidos de VP5; ● péptidos de VP8; -- O péptidos de VP3.

péptido estructural que incorpora éstos isótopos es el polipéptido VP7 - confirmando los reportes anteriores (Fig. 6 A).

Los carbohidratos de una glicoproteína pueden estar unidos -- a través de enlaces O-glicosídicos o N-glicosídicos. En las glicoproteínas virales solamente se han encontrado enlaces N-glicosídicos, donde --- siempre una molécula de N-acetilglucosamina está unida covalentemente a - un residuo de asparagina que se encuentra dentro de la secuencia -Asn-  
x-<sup>(trp)</sup>  
-<sup>(ser)</sup>. Existen 2 tipos de cadenas N-glicosídicas en todas las glicoproteínas virales que se han estudiado hasta ahora: un tipo llamado de "alta manosa" que contiene N-acetilglucosamina y manosa; y otro tipo llamado "complejo" que contiene además galactosa, fucosa y ácido siálicos. Ambos tipos tienen un "core" compuesto de manosa y N-acetilglucosamina que se - continúa en rama de carbohidratos dependiendo del tipo de que se trate.

Dos tipos de endoglicosidasas son utilizadas para el estudio de la estructura de las cadenas glicosídicas, que generalmente permiten - distinguir el tipo de glicoproteína: La endo -N-acetilglucosaminidasa H o Endoglicosidasa H aislada de Streptomyces sp. que hidroliza preferentemente las glicoproteínas de alta manosa; y la endo -N-acetilglucosaminidasa D o Endoglicosidasa D obtenida de Diplococcus pneumoniae que generalmente hidroliza las glicoproteínas complejas (53).

Para estudiar que tipo de cadena glicosídica es la que se encuentra en el polipéptido VP7 y la migración de este polipéptido no glicosilado, se trató un virus purificado, marcado ya sea con metionina <sup>35</sup>S o

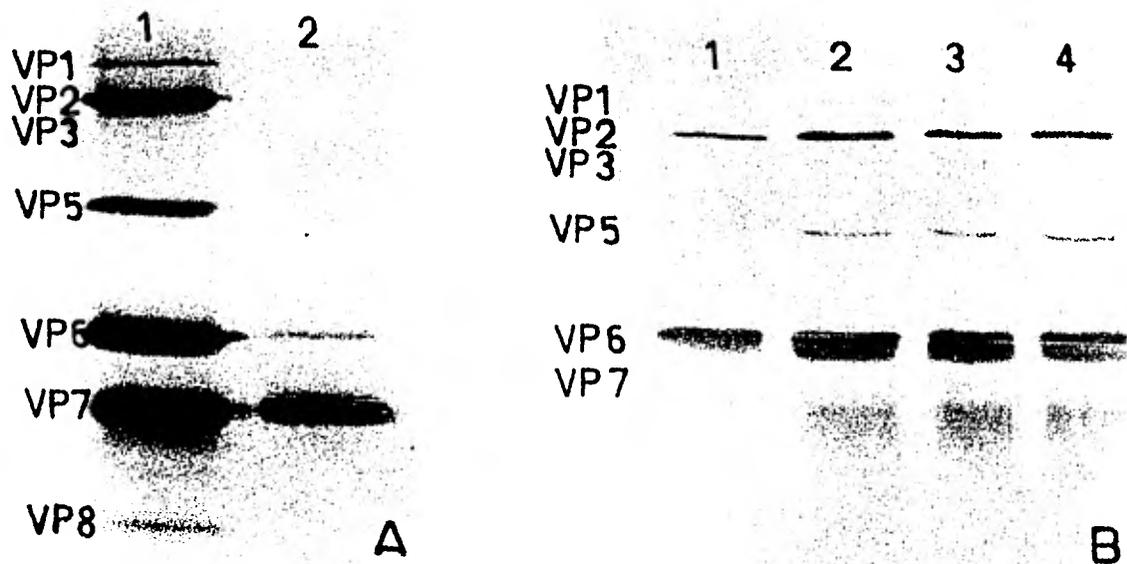


Figura 6. A) Electroforesis del virus SA 11 marcado con metionina <sup>35</sup>S (carril 1) virus marcado con glucosamina <sup>3</sup>H (carril 2). B) El virus SA 11 purificado y marcado con metionina <sup>35</sup>S se incubó con: endoglicosidasa H (por 15 min a 37°C); 1) sin glicosidasa; 2) 0.25 UI/ml; 3) 1.25 UI/ml y 4) 2.5 UI/ml.

con manosa <sup>3</sup>H con diferentes concentraciones de endoglicosidasa H. Estos resultados se observan en la Fig. 6 B. Cuando el polipéptido VP7 está -- marcado con manosa <sup>3</sup>H y es incubado con la endoglicosidasa H, la banda -- correspondiente a VP7 desaparece (datos no mostrados); cuando ésta protefina está marcada con metionina <sup>35</sup>S se observa que su movilidad electroforética aumenta. Dada la especificidad de la endoglicosidasa H, estos datos sugieren que las cadenas glicosídicas de la glicoprotefina VP7 son del tipo de "alta manosa".

Como se puede observar en las Figs. 2 y 3, existe otro polipéptido que migra un poco más rápido que VP7, con la movilidad observada para VP7 después del tratamiento con endoglicosidasa H, llamada VP7a, presente en algunas preparaciones de virus purificado. Cuando se comparan los hidrolizados parciales generados por quimotripsina y proteasa V8 de los polipéptidos VP7 y VP7a se observa un patrón muy similar (Fig. 7) de acuerdo con lo sugerido en experimentos preliminares por Mason et al. (44) que se proponen que VP7a es un precursor no glicosilado o en distinto estado de glicosilación del polipéptido VP7.

#### Distribución de los Polipéptidos en la Capa Externa y en la Capa Interna del virus

Se ha reportado 48 que VP5 y VP6 se encuentran únicamente en partículas de doble cápsida ("livianas") y VP3 y VP4 se encuentran en partículas sin la capa externa ("pesadas"). Por esto resulta de interés analizar la distribución de los polipéptidos del rotavirus SA 11 purificado -

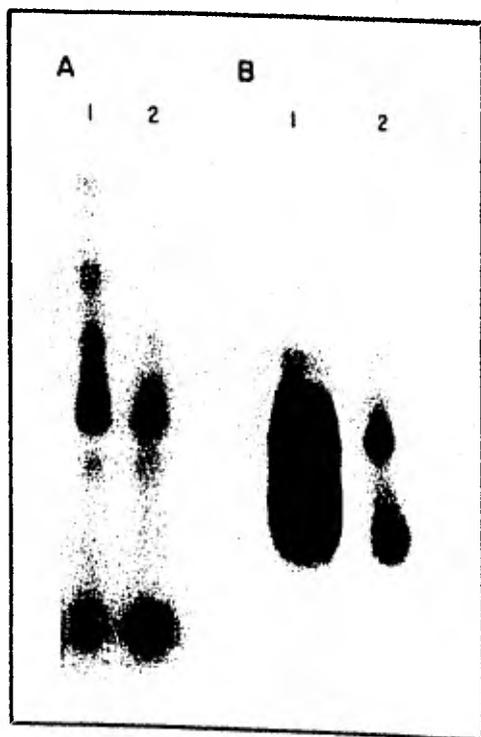


Figura 7. Comparación de los péptidos generados por hidrólisis con proteasas de los polipéptidos VP7 y VP7a del virus SA 11 purificado y marcado con metionina  $^{35}\text{S}$ .  
 A. 1) VP7 y 2) VP7a tratados con quimotripsina. ---  
 B) 1) VP7 y 2) VP7a tratados con proteasa VB.

en ausencia de tripsina para evitar el rompimiento de VP3.

Se disoció la capa externa del virus mediante el tratamiento con EDTA y se separaron las partículas de una sola cápside ( $\rho = 1.39 \text{ g/cm}^3$ ) de las proteínas de la capa externa ( $\rho = 1.30 \text{ g/cm}^3$ ) centrifugando a equilibrio en CsCl y estas dos fracciones se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS. En la Fig. 8 se observa que los polipéptidos VP3 y VP7 están asociados con las partículas de doble cápside y son liberados al tratar el virus con EDTA, mientras que los polipéptidos VP1, VP2 y VP6 están presentes en las partículas de una sola cápside, a diferencia del reporte donde se menciona que VP3 está en la cápside interna, en este trabajo, el polipéptido VP3 es liberado con el tratamiento con EDTA, lo que sugiere que se localiza en la capa externa del virus.

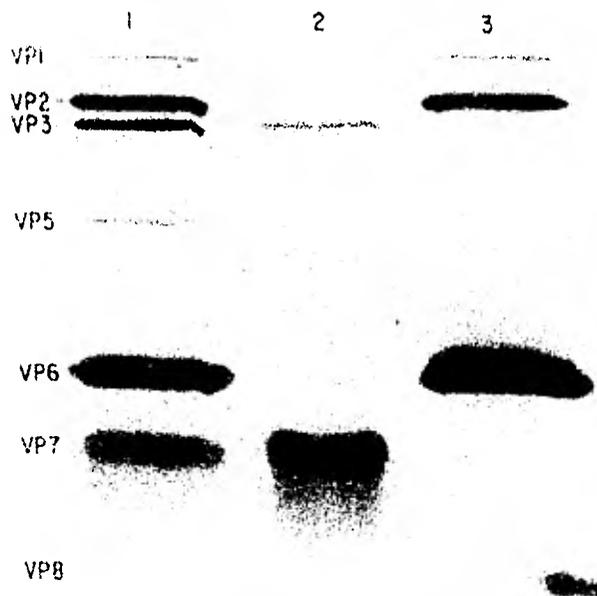


Figura 8. Polipéptidos en el virus de doble cápside (carril 1) cápside externa (carril 2), y virus de una sola cápside (carril 3). Virus SA II marcado con una mezcla de a.a.<sup>3</sup>H, purificado evitando la acción de la tripsina, fue tratado con EDTA y los polipéptidos liberados fueron separados de las partículas de una sola cápside por centrifugación a equilibrio en CsCl.

## DISCUSION

El análisis cuidadoso de la composición de polipéptidos del rotavirus SA 11, indica que la estructura del virión es más simple de lo que se había reportado anteriormente. Estos estudios habían indicado la existencia de ocho a diez (42,43,48,49) polipéptidos en las partículas purificadas.

En este trabajo se demuestra que los viriones de SA 11 están constituidos, muy probablemente, de sólo cinco polipéptidos: VP1, VP2, VP3, VP6, y VP7, de los que VP3 y VP7 conforman la capa externa y que los polipéptidos VP5 y VP8 observados anteriormente son producto del rompimiento por tripsina del polipéptido VP3.

El polipéptido VP4 reportado por Smith et al. (49) sólo se observa ocasionalmente en nuestras preparaciones y en las de Mason et al. (44); y aún en las preparaciones de Smith et al. no es muy constante la presencia de este polipéptido. En este trabajo, el polipéptido que es cortado por la tripsina, se ha llamado VP3 aunque no es posible establecer una correlación fuerte con el polipéptido VP3 de Maso et al. (44) o I<sub>3</sub> de Smith et al. (49). Se ha llamado así, ya que cuando ocasionalmente se observa una cuarta banda entre los polipéptidos mayores, ésta migra debajo del polipéptido que es procesado por la tripsina. Sin embargo es dudoso considerar al polipéptido VP4 como un componente estructural del virus, ya que en experimentos preliminares hemos observado que -

al tratar el virus con quimotripsina se produce un polipéptido con una migración similar. Es posible que esto ocurra frecuentemente, ya que la mayoría de las preparaciones de tripsina utilizada para aumentar el rendimiento viral, tienen esta actividad contaminante (46).

En algunos reportes en los que se observa el polipéptido VP5 de SA 11 no mencionan que se utilizó tripsina durante la infección, pero es posible que no lo hayan mencionado ya que este tratamiento se ha convertido en un procedimiento común. Otra posibilidad es que en algunos laboratorios se utiliza tripsina para subcultivar las células y este rompimiento puede ocurrir con la tripsina remanente. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que exista una proteasa celular capaz de cortar pequeñas cantidades de VP3, ya que aún en las preparaciones más cuidadosas de SA 11 se pueden observar trazas de VP5 y VP8.

Como se había reportado (48) el polipéptido VP7 es una glicoproteína que contiene en su cadena glicosídica glucosamina y manosa. Al incubar esta glicoproteína en presencia de endoglicosidasa H, disminuye el peso molecular de este polipéptido, y los carbohidratos que se habían incorporado son liberados, lo que sugiere, dada la especificidad de esta enzima, que se trata de una glicoproteína con cadenas glicosídicas del tipo de "alta manosa"; sin embargo, no se determinó si esta glicoproteína es resistente a la endoglicosidasa D (que generalmente corta las cadenas glicosídicas "complejas") lo que permitiría especificar el tipo de cadena glicosídica de este polipéptido.

El polipéptido VP7 al ser tratado con endoglicosidasa II migra electroforéticamente a una posición muy similar a cercana a la de VP7a. Este último polipéptido podría ser el precursor no glicosilado o un producto intermedio menos glicosilado generado ya sea durante los pasos de biosíntesis de esta glicoproteína o por degradación (el que VP7a sea un componente indispensable de las partículas virales queda por ser demostrado). Para mostrar cual es el precursor no glicosilado del polipéptido VP7 es necesario hacer experimentos de pulso y caza en los que sea posible observar la transición de este precursor al producto final.

En nuestras preparaciones de virus, al igual que en las de Rodger et al. (48) no se observa el polipéptido VP5a reportado por Mason et al. (44); en vista del origen de VP5 es posible que VP5a sea un producto de rompimiento de un polipéptido mayor por otras proteasas, que se encuentren como contaminantes de la tripsina empleada para aumentar el rendimiento del virus.

El análisis de los polipéptidos de SA 11 de Smith et al. (49) aparece un polipéptido pequeño en bajas cantidades llamado O<sub>4</sub>, esta proteína no se observa en nuestras preparaciones de virus purificado, pero se observa en gran cantidad en las células infectadas (49, Arias C. datos no publicados) por lo que es posible que su presencia en el virus purificado se deba en una pequeña proporción de partículas virales con polipéptidos no estructurales, como contaminantes.

Por traducción in vitro de los mensajeros de SA 11 (44) o del RNA viral desnaturalizado (49) no se observan los polipéptidos VP5 y VP8, lo cual puede explicarse tomando en cuenta que estos polipéptidos provienen del rompimiento de VP3. En experimentos de asignamiento de los segmentos de RNA del virus por los polipéptidos que codifican, se observó -- que el segmento 5 de RNA codificaba por el polipéptido O<sub>1a</sub> (que también se encontraba en células infectadas, pero no en el virus purificado); y ya que este polipéptido era considerado como el posible precursor de O<sub>1</sub> (VP5) (5) se asumió entonces que el segmento 5 de RNA codificaba por una proteína estructural. Este trabajo sugiere que el segmento 5 de RNA de SA 11 codifica por un polipéptido no estructural, dado el origen de VP5.

El incremento de la infectividad de los rotavirus con tripsina ha sido observado ampliamente en aislados de diferentes especies (50, 61-64). Es posible que el rompimiento de un polipéptido mayor, sea un -- mecanismo general para aumentar la infectividad de estos virus ya que la mayoría de los rotavirus que han sido analizados contienen un polipéptido con una migración electroforética similar al polipéptido VP5 de SA 11 -- (41-48, 50, 51).

El rompimiento específico observado en este trabajo es similar al que ha sido observado con las glicoproteínas F y HA de los paraximovirus y mixovirus respectivamente que se requiere para obtener virus -- infecciosos actuando, probablemente, al nivel de la penetración del virus a la célula. En muchas células existe una proteasa en la membrana que activa al virus, pero generalmente las células de líneas no contienen estas

proteasas y el virus es incapaz de penetrar y por lo tanto de replicarse, al menos de que se agregue una proteasa exógena (65). Recientemente se ha descrito la formación de liposomas que contienen el polipéptido HA del virus de influenza y se ha demostrado más claramente que el rompimiento de HA por una proteasa resulta en la fusión del virus con la membrana de la célula huésped y por consiguiente en la penetración del virus en la célula (66).

Se ha demostrado que el extremo amino terminal generador por el corte de la proteína F1 de los paramixovirus y HA<sub>2</sub> de los virus de influenza tienen bastante homología en su secuencia, y que oligopéptidos sintetizados químicamente, que mimetizan la secuencia de estos extremos N-terminales, son capaces de inhibir la replicación de estos virus en cultivo de células. Estos inhibidores han sido sugeridos como novedosas herramientas en el control de enfermedades virales (65).

Aunque los experimentos de marca con azúcares radioactivos y los experimentos con endoglicosidasa H indican que el polipéptido VP3 no es una glicoproteína, es posible que la activación por tripsina observada en rotavirus sea similar al descrito para los pesamixovirus y los mixovirus. Sin embargo para poder hacer una analogía, es necesario hacer estudios más extensos, como el de explorar la capacidad de algún péptido proveniente de VP5 ó de VP8 para inhibir la infección por rotavirus SA 11 en cultivo de células y su posible acción en animales experimentales.

Se ha observado que la infección asintomática por rotavirus es muy frecuente en neonatos (68,69). Un alto porcentaje de neonatos que

son infectados por rotavirus no presentan diarrea, aunque excretan virus en las heces, pero en menor cantidad que los niños mayores que presentan diarrea por rotavirus (69). Los intentos de relacionar la infección -- asintomática con los niveles de anticuerpos maternos, han fracasado (68) y no existe una explicación simple de este fenómeno. El requerimiento de los rotavirus por la tripsina u otra proteína para producir una infección eficiente podría explicar este fenómeno, si la actividad de tripsina y otras enzimas pancreáticas se encuentra disminuida en humanos durante -- los primeros días de vida, como sucede en algunas especies de mamíferos (71).

Es un hecho ampliamente aceptado la protección del calostro de la infección por rotavirus (31)(38% de los niños alimentados con leche materna sufrieron infecciones por rotavirus versus, el 87% de casos de infección entre los niños alimentados con otro tipo de leches) (68). Esta protección ha sido explicada por la presencia de anticuerpos anti-rotavirus en el calostro (72). Sin embargo es posible que en esta protección también tengan un papel importante los inhibidores de tripsina presentes en el calostro (70).

REFERENCIAS

1. Light, J.S., and Hodes H.L. 1943. Studies on epidemic diarrhea of the newborn: isolation of a filtrable agent causing diarrhea in calves. Am. J. publ. Hlth. 33: 1451-1454.
2. Kraft, L.M. 1958. Observations on the control and natural history of epidemic diarrhea of infant mice (EDIM). Yale J. Biol. Med. 31: 121-137.
3. Mobus C.A. Underdahl N.R., Rhodes M.B., and Twiehaus M.J. 1969. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. Univ. Neb. Agric. Exp. Station. Res. Bull. 233: 1-46.
4. Bishop R.F. Davidson G.P., Holmes I.H. and Ruck B.J. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. Lancet ii: 1281-1283.
5. Flewett T.H., Bryden A.S., and Davies H. 1973. Virus particles in gastroenteritis. Lancet ii: 1497.
6. Flewett T.H., Bryden A.S., Davies H., Woode G.N., Bridger J.C., and Derrick J.M. 1974. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. Lancet ii: 61-63.
7. Middleton P.J. Szymanski M.T., Abbott G.D., Bortolussi R., and Hamilton J.R. 1974. Orbivirus acute gastroenteritis of infancy. Lancet i: 1241-1244.
8. Davidson G.P., Bishop R.F., Townley R.R.W. Holmes I.H. and Ruck B.J. 1975. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. Lancet i: 242-245.

9. McNulty M.S. 1978 Rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 40: 1-18.
10. Lecce J.G., King M.W., and Mock R. 1976. Reovirus-like agent associated with fatal diarrhea in neonatal pigs. *Infect. Immun.* 14: 816-825.
11. McNulty M.S., Pearson G.R., McFerran J.B., Collins D.S., and Allan G.M. 1976. A reovirus-like agent (rotavirus) associated with diarrhea in neonatal pigs. *Vet. Microbiol.* 1: 55-63.
12. McNulty M.S., Allan G.M., Pearson G.R., McFerran J.B., Curran W.L. and McCracken R.M. 1978. Reovirus like agent (rotavirus) from lambs. *Infect. Immun.* 14: 1332-1338.
13. Snodgrass D.R., Smith W., Gray E.W., and Herring J.A. 1976. A rotavirus in lambs with diarrhea. *Res. Vet. Sci.* 20: 113.
14. Flewett T.H., Bryden A.S., and Davies H. 1975. Virus diarrhoea in foals and other animals. *Vet. Rec.* 96: 477.
15. Bryden A.S., Thouless M.E., and Flewett T.H. 1976. Rotavirus in rabbits. *Vet. Rec.* 99: 323.
16. Reed D.E., Deley C.A., and Shave H.J. 1976. Reovirus like agent associated with neonatal diarrhoea in pronghorn antelope. *J. Wild. Dis.* 12: 488-491.
17. Tziposi S. and Caple I.W. 1976. Isolation of a rotavirus from deer. *Vet. Rec.* 99: 398.
18. McNulty M.S., Allan G.M., and McFerran J.B. 1976. Isolation of a citopathic calf rotavirus. *Res. Vet. Sci.* 21: 114-115.

19. Malherbe H.H., and Strickland-Cholmsley M. 1967. Simian virus SA 11 and the related O agent. Arch. ges. Virusforsch. 22: 235-245.
20. Bryden A.S., Davies H.A., Hadley R.E., Flewett T.H., Molris G.A., and Oliver P. 1975. Rotavirus enteritis in the west midlands during 1974. Lancet ii: 241-243.
21. Kapikian A.Z., Kim H.W., Wyatt R.G., Cline W.L., Arrobio J.L., Brandt G.D., Rodriguez W.S., Sack D.A., Chanock R.M. and Parrot R.H. Human reovirus-like associated with winter gastroenteritis. New. Eng. J. Med. 294: 965-972.
22. Espejo R.T., Calderón E., González N., Salomon A., Martuscelli A., and Romero P. 1978. Rotavirus gastroenteritis in hospitalized infants and young children in Mexico City. Ev. Lat. Microbiol. 20: 239-246.
23. Espejo R.T., Calderón E., González N., Salomon A., Martuscelli A., and Romero P. 1979. Presence of two distinct types of rotavirus in infants and young children hospitalized with acute gastroenteritis in Mexico City 1977. J. Infect. Dis. 4: 474-477.
24. Holmes I.H. 1979. Viral gastroenteritis. Prog. Med. Virol. 25: 1-36.
25. Espejo R.T., Calderón E., and González N. 1977. Distinct reovirus-like agents associated with acute infantile gastroenteritis. J. Clin. Microbiol. 6: 502-506.
26. Susuki H., and Konnot. 1975. Reovirus like particles in jejunal mucosa of Japanese infant with acute infectious non-bacterial gastroenteritis. Tohoku J. Exp. Med. 115: 199-211.

27. Mebus, C.A., Stair E.L., Underdahl N.R., and Twiehaus M.J. 1971. Pathology of neonatal calf diarrhea induced by a reo-like virus. *Vet. Patho.* 8: 490-505.
28. Theil K.W., Bohl E.H., Cross R.F., Kohler E.M. and Agnes A.C. 1978. Pathogenesis of porcine rotaviral infection. *Am. J. Vet. Res.* 39: 213-220.
29. Estes M.K., Graham D.Y., Gesba C.P. and Smith E.M. 1979. Simian rotavirus replication in cell cultures. *J. Virol.* 31: 810-816.
30. Graham D.Y., and Estes M.K. 1980. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: *Biological Mechanisms Virol.* 101: 432-439.
31. Palmer E.L., Martin M.L., and Murphy F.A. 1977. Morphology and stability of infantile gastroenteritis virus: comparison with reo-virus and blue-tanguevirus. *J. Gen. Virol.* 35: 403-414.
32. Esparza J., and Gil F. A study on the ultrastructure of human rotavirus. *Virol.* 91: 141-150.
33. Flewett T.H., and Woode G.N. 1978. The rotaviruses. *Arch. Virol.* 57: 1-23.
34. Bishop R.F., Davidson G.P., Holmes I.H. and Ruck B.J. 1974. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet* i: 149-151.
35. Cohen, J. 1977. Ribonucleic acid polymerase activity associated with purified calf rotavirus. *J. Gen. Virol.* 36: 395-402.
36. Bridger J.C., and Woode G.N. 1976. Characterization of two particle types of calf rotavirus. *J. Gen. Virol.* 31: 245-250.

37. Elias M.M. 1977. Separation and infectivity of two particle types of human rotavirus. *J. Gen. Virol.* 37: 191-194.
38. Schnagl, R.D., and Holmes I.H. 1976. Characteristics of the genome of human infantile enteritis virus (Rotavirus). *J. Virol.* 19: 267-270.
39. Kalica A.R., Garon C.F., Wyatt R.G., Mobus C.A., Vankirk D.H., Chanock R.M. and Kapikran A.Z. 1976. Differentiation of human and calf rotavirus-like agents associated with diarrhea using polyacrylamide gel electrophoresis of RNA. *Virol.* 74: 86-92.
40. Barnett B.B., Egbert L.N., and Spendlove R.J. 1978. Characteristics of calf diarrhea virus ribonucleic acid can. *J. Comp. Med.* 42: 46-53.
41. Newman J.F.E., Brown F., Bridger J.C., and Woode G.N. 1975. Characterization of a rotavirus. *Nature (London)* 258: 631-633.
42. Espejo R.T., Martínez E., López S., and Muñoz O. 1980. Different polypeptide composition of two human rotavirus types. *Infect. Immunity* 28: 351-354.
43. Kalika A.R., and Theodore T.S. 1979. Polypeptides of simian rotavirus (SA 11) determined by a continuous polyacrylamide gel electrophoresis method. *J. Gen. Virol.* 43: 463-466.
44. Mason B.B., Graham D.Y., and Estes M.K. 1980. *In vitro* transcription and translation of simian rotavirus SA 11 gene products. *J. Virol.* 33: 111-121.
45. Matsuno S., and Mukoyama A. 1979. Polypeptides of bovine rotavirus. *J. Gen. Virol.* 43: 309-316.
46. Obijeki J.P., Palmer E.L., and Martin M.L., 1977 Biochemical characterization of infantile gastroenteritis virus (IGV). *J. Gen. Virol.* 34 485-497.

47. Rodger S.M., Schnagl R.D., and Holmes I.H. 1975. Biochemical and Biophysical characteristics of diarrhea viruses of human and calf origin. *J. Virol.* 16: 1229-1235.
48. Rodger S.M., Schnagl R.D., and Holmes I.H. 1977. Further biochemical characterization including the detection of surface glycoproteins of human, calf and simian rotaviruses. *J. Virol.* 24: 91-98.
49. Smith N.L., Ladzing I., and Holmes I.H. 1980. Coding assignments of double-stranded RNA segments of SA 11 rotavirus established by in vitro translation. *J. Virol.* 33: 976-982.
50. Thouless M.E. 1979. Rotavirus polypeptides. *J. Gen. Virol.* 44: 187-197.
51. Todd D., and McNulty M.S. 1977. Biochemical studies on a reovirus like agent (rotavirus) from lambs. *J. Virol.* 21: 1215-1218.
52. Huang A.S. 1980. Viral glycoproteins: A collection of reviews. Introduction. *Rev. Infect. Dis.* 2: 26-40.
53. Briles E.B., Kornfeld S. 1978. Lecitin-resistant cell surface variants of eukariotic cells. *TIBS.* 223-227.
54. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680-685.
55. Bonner W.M., and Laskey R.A. 1974. A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46: 83-86.

56. Cleveland D.W., Fischer S.G, Kirschner M.W., and Laemmli U.K. 1977. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 1102-1106.
57. Morrison T.G. 1975. Site of synthesis of membrane and nonmembrane protein of vesicular stomatitis virus. *J. Biol. Chem.* 250: 6955-6962.
58. Scott J.V., Stowring L., and Haase A.T. 1979. Antigenic variation in visna virus cell 18: 321-327.
59. Kopchick J.J., Karshin W.L., Wood T.G. and Artinghaus R.B. 1980. The structural relatedness of the virus core proteins of Rausher and Moloney Murine leukaemia virus. *J. gen. Virol.* 47: 1-10.
60. Roekest R.R. 1965. Studies on the structure of virus of the columbia SK group II. the protein subunits of ME-virus and others members of the columbia SK group virology. 26: 345-358.
61. Almeida J.D., Hall T., Batnavala J.E. Totardell B.M. and Crystie I.L. 1970. The effect of trypsin on the growth of rotavirus. *J. Gen. Virol.* 40: 213-218.
62. Babluk L.A., Mohamed K., Spence L., Fauvel M. and Petro, R. 1979. Rotavirus isolation and cultivation in the presence of trypsin. *J. Clin. Microbiol.* 6: 610-617.
63. Barnett B.B., Spandlove R.S., and Clark M.K. 1979. Effect of enzymes on rotavirus infectivity. *J. Clin. Microbiol.* 10: 111-113.
64. Moosai R.B., Gardner P.S., Almedida J.D., and Greenaway M.A. 1979. A simple immunofluorescent technique for the detection of human rotavirus.

65. Choppin P.W. and Scheid A. 1980. The role of viral glycoproteins in adsorption, penetration and pathogenicity of viruses. *Rev. Infect. Dis.* 2: 40-61.
66. Huang, R.T.C., Wahn K., Klenk D., and Rott R. 1980. Fusion between cell membranes and liposomes containing the glycoproteins of influenza virus. *Virology* 104: 294-302.
67. Wyatt, R.G., James W.D., Bohl E.H., Theil K.W., Salf L.J., Kalika R.A. Greenberg H.B., Kapikian A.Z., and Chanock R.M. 1980. Human rotavirus type 2: cultivation in vitro. *Science* 207: 189-190.
68. Totterdell B.M., Chrystie I.L. and Banatvala J.E. 1976. Rotavirus infection in a maternity unit-asch. *Dis. Child.* 51: 924-928.
69. Chrystie I.L., Totterdell B.M., and Banatvala J.E. 1978. Asymptomatic endemic rotavirus infections in the newborn. *Lancet* i: 1176-1178.
70. Laskowski M.S., and Laskowski M. 1951. *J. Biol. Chem.* 190 563.
71. Henning S.J., and Kretschmer N. 1973. Development of intestinal function in mammals. *Enzyme* 15: 3-23.
72. McLean B., Sonza S., and Holmes I. H. 1980. Measurement of immunoglobulin A, G, and M class in rotavirus antibodies in serum and mucosal secretions. *J. Clin. Microbiol.* 12: 314-319.