

193

**COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**



**EFFECTO DE LA INHIBICION DE LA GLICOSILACION
EN LA REPLICACION DEL ROTAVIRUS
DE SIMIO SA11**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA**

P R E S E N T A

CLAUDETTE MUSALEM YOUNES

MÉXICO, D. F.

1981



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.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

MATERIAL Y MÉTODOS

Virus

Cultivo de células

Preparación de partículas virales marcadas radiactivamente

Purificación de virus marcado radiactivamente

Electroforesis

Hemaglutinación

RESULTADOS

Partículas virales intracelulares en células infectadas con SAll

Partículas virales sintetizadas al agregar tunicamicina desde el inicio de la infección

Partículas virales sintetizadas al agregar tunicamicina a las 2 h. post-infección

DISCUSIÓN

INTRODUCCIÓN:

Los rotavirus son uno de los principales agentes causantes de diarrea en humanos y otros mamíferos (1,2,3).

La primera publicación de infección por rotavirus apareció en 1943 cuando Light y Hodes (4) describieron que la diarrea se podía transmitir entre terneras utilizando filtrados de heces de humanos. Mebus et. al. (5), en 1969, logró transmitir la enfermedad en animales experimentales, inoculando oral o intraduodenalmente filtrados de heces. La caracterización de éstos virus mostró que eran similares al grupo de reovirus en cuanto a su forma y a algunas propiedades químicas, aunque no estaban relacionados serologicamente.

En estudios posteriores Bishop et. al. (6), tomando biopsias duodenales de niños con gastroenteritis, encontró vesículas citoplásmicas conteniendo un gran número de partículas virales semejantes a las descritas en terneras. Estos virus, a diferencia de los reovirus y los orbivirus presentaban una capa externa bien definida. Más tarde aparecieron estudios de éstas partículas semejantes a reovirus y a orbivirus encontradas en gran cantidad en las heces de un gran número de especies animales (7,8,9), y se sugirió que éstos virus debían ser incluidos como un grupo en un mismo género dentro

de la familia Reoviridae. Flewett (10) demostró la similitud serológica y morfológica entre virus de gastroenteritis aguda de humanos y terneras y sugirió el nombre de rotavirus.

Posteriormente Lecatsas et. al. (11,12) sugirió que el agente O, aislado de lavados intestinales de ovinos y bovinos, y el virus SAll, aislado de un lavado rectal de mono, debían ser incluidos dentro del grupo de los rotavirus. Existen evidencias de que el virus EDIM, de ratones recién nacidos, pertenece también al grupo de los rotavirus (13). Posteriormente, estudios comparativos han demostrado que los rotavirus de humano, ternera, cerdo, borrego, venado, SAll y EDIM son morfológicamente indistinguibles entre sí (14,15,16).

Los rotavirus están formados por un genoma que consta de once segmentos de RNA de doble cadena con pesos moleculares desde aproximadamente 2×10^6 a 0.2×10^6 , y que se encuentra recubierto por dos capas proteicas. Las partículas completas presentan un diámetro de 70 nm. En las preparaciones de rotavirus también se encuentran frecuentemente partículas de 60 nm que corresponden a virus sin capa externa (17,18); éstas partículas pueden separarse de las partículas completas por centrifugación isopícnica en gradientes de CsCl. La partícula completa presenta una densidad de 1.36 g/ml y la

partícula sin capa externa una densidad de 1.38 g/ml (19).

Los polipéptidos estructurales pertenecientes a la capa externa e interna del virión se han caracterizado en distintas especies (20,21,22,23), sin embargo los diferentes estudios son conflictivos en cuanto al número de polipéptidos (que varía de 5 a 10), como en el peso molecular de los mismos.

Entre las actividades presentes en el virión se ha descrito la presencia de una RNA polimerasa RNA dependiente (24,25), la cual se activa al quitar la capa externa. También se ha encontrado que preparaciones de rotavirus de ternera aglutinan eritrocitos de varias especies, y que un componente de la capa externa es el responsable de la hemaglutinación (26).

Existen varios estudios sobre las relaciones antigénicas entre rotavirus de distintas especies, se ha demostrado que rotavirus de distintas especies cruzan por pruebas de fijación de complemento e inmunofluorescencia (27,28), indicando la presencia de un antígeno de grupo. Además del antígeno de grupo existen antígenos especie-específicos, demostrados por pruebas de neutralización e inhibición de la hemaglutinación (29,30). La localización de éstos dos tipos de antígenos se ha demostrado por inmunomicroscopía electrónica (31). Los antígenos de grupo se encuentran

en la capa interna y los antígenos especie-específicos en la capa externa.

La morfogénesis de los rotavirus de distintas especies se ha observado en cultivo de células (32,33,34,35,36): existe variación en el tamaño de partículas virales encontradas en los diferentes estudios, sin embargo todos coinciden en describir la acumulación de material denso granular (viroplasma) próximo a vesículas de retículo endoplásmico rugoso en cuyas membranas parece ocurrir el ensamble de partículas virales. Estas partículas probablemente adquieren la capa externa a través de un proceso de gemación al entrar al retículo endoplásmico. Los datos sugieren que la formación del virus se da a través de partículas subvirales intermedias, completándose la maduración al entrar éstas al lumen del retículo endoplásmico.

Aunque recientemente se ha podido crecer en cultivo un virus aislado de humano (cepa Wa) (37), se ha utilizado en este trabajo, como modelo, el rotavirus de simio SAll, el cual es morfológicamente indistinguible del rotavirus humano y si crece en varias líneas celulares.

El análisis de SAll purificado ha demostrado que la capa interna de éstos virus está formada por tres polipeptidos

(VP1, VP2 y VP6) y la capa externa por dos polipéptidos (VP3 y VP7) (38). El polipéptido VP3, por acción de la tripsina, se rompe para dar dos polipéptidos denominados VP5 y VP8. Este rompimiento produce un aumento de la infectividad del virus en cultivos celulares (38). El polipéptido VP7 es una glicoproteína con cadenas glicosídicas del tipo alta manosa ya que es sensible a digestión con endoglicosidasa H (39,40). La proporción de VP7 glicosilado y no o parcialmente glicosilado (pVP7) presente en el virus puede variar de una preparación a otra (Fig. 1B y C).

En extractos de células infectadas se ha encontrado, además de éstos polipéptidos estructurales, 6 proteínas no estructurales (NCVP1, NCVP2, NCVP3, NCVP4, NCVP5 y NCVP6) (Fig. 1A). Los polipéptidos NCVP5 y NCVP6 son glicoproteínas con cadenas glicosídicas del tipo alta manosa (39). La infección con SAll en presencia de tunicamicina (inhibidor de la glicosilación) ha permitido la observación de los precursores no glicosilados de las proteínas VP7, NCVP5 y NCVP6 (39).

En virus con membrana lipídica, todos los cuales contienen glicoproteínas, éstas son transportadas del retículo endoplásmico a la membrana citoplasmática, a través

del aparato de Golgi, como proteínas insertadas en membranas de vesículas (41,42). Es posible que las glicoproteínas de SALL no sean transportadas a la membrana citoplasmática sino que todo el proceso de maduración del virus ocurra en el retículo endoplásmico.

Siendo los rotavirus los únicos virus conocidos que a pesar de presentar glicoproteínas del tipo N-glicosídico en su superficie, no contienen una membrana con lípidos, constituyen un modelo único para el estudio del papel de las glicoproteínas no insertadas en membrana en el ensamble de los virus.

Los inhibidores de la glicosilación se han empleado para el estudio del papel biológico de las glicoproteínas en varios sistemas. Uno de los inhibidores más utilizados es la tunicamicina. En las glicoproteínas, donde los oligosacáridos se encuentran unidos a la proteína a través de un enlace N-glicosídico, la tunicamicina al inhibir la formación de intermediarios N-acetilglucosamina-lípido, que actúan como donadores de azúcar en la cadena nascente de la proteína, bloquea por completo la glicosilación (40,43).

Existen varios ejemplos en la literatura sobre el papel que tienen las glicoproteínas en la formación de los

virus con envoltura lipídica (44,45,46,47). Estos virus adquieren su envoltura por un proceso de gemación en la superficie celular.

En el virus de estomatitis vesicular y en los alfavirus Sindbis y Semliki Forest se ha encontrado que al inhibir la glicosilación no se lleva a cabo el ensamble de viriones y que esto es debido a que las proteínas no glicosiladas no agregan en retículo endoplásmico (44,46,47,48).

En el fowl plague virus se ha encontrado que al inhibir la glicosilación no se lleva a cabo el ensamble de partículas virales y que esto es debido a que la síntesis de la hemaglutinina de éstos virus, en su forma no glicosilada, es muy sensible a proteasas celulares (46).

En el virus influenza, al inhibir la glicosilación, sí se lleva a cabo el ensamble de viriones, pero éstos no presentan actividad hemaglutinante (48).

También se ha observado que la formación del virus del Sarcoma de Rous ocurre al inhibir la glicosilación, aunque las partículas ensambladas presentan muy baja infectividad (46).

En este trabajo se llevó a cabo el estudio de partículas virales intracelulares, sintetizadas durante la infección con rotavirus SAll y se determinó el efecto de la inhibición de la glicosilación sobre el ensamble de éstas partículas virales.



VP1
VP2
VP3, NCVPI



NCVP2

VP6

VP7

NCVP3

NCVP4

NCVP5

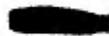
NCVP6

pNCVP5

A B



VP1
VP2
VP3



VP6



VP7
pVP7

C

MATERIAL Y MÉTODOS:

VIRUS:

El rotavirus de simio SAll, adaptado a crecimiento en cultivo de células, se obtuvo del Dr. H.H. Malherbe de la Universidad de San Antonio Texas.

CULTIVO DE CÉLULAS:

El rotavirus SAll se creció en una línea de células epiteliales de riñón de mono, MA104. Las células fueron crecidas a 37°C y bajo 5% CO₂ en medio mínimo esencial de Eagle (MEM) con 250 ug/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin y 10% de suero bovino fetal como se ha descrito anteriormente (23).

PREPARACIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES DE SALL MARCADAS RADIOACTIVAMENTE:

Las monocapas confluentes de células MA104, en frascos de plástico de 25 cm², se lavaron dos veces con solución amortiguadora fosfatos-salina (PBS: 136mM NaCl, 2mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1mM KH₂PO₄, 0.9mM CaCl₂ y 0.4mM MgCl₂) y se infectaron con virus SAll. El virus se dejó adsorber durante 1 h. a 37°C. En todas las preparaciones se utilizó tripsina (Difco 10 µg/ml final) durante el período de adsorción del virus a la célula, para aumentar el rendimiento del virus en cultivo (38).

En todos los experimentos las células infectadas se marcaron con ^{35}S -metionina inmediatamente después del período de adsorción. Para esto, las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con MEM con bajo contenido de metionina (0.3 mg/ml) y 50 μCi de ^{35}S -L-metionina (500 Ci/mMol NEN Corp.).

En los experimentos en los cuales se agregó tunicamicina ésta se añadió en el medio a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$.

El cultivo de células infectadas fué cosechado las 2 h. post-infección, a menos que se indique otra cosa, y los lisados se extrajeron en seguida con un volumen igual de trifluorotricloroetano. Posteriormente las partículas en la fase acuosa (0.5 ml.) se sedimentaron en un gradiente continuo de sacarosa (15%-45% en solución amortiguadora TSM: 0.01M Tris-hidroximetilaminoetano, 0.15M NaCl y 0.001M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pH 8.2) centrifugando a 24 000 rpm durante 90 min. a 5°C en el rotor SW40 de la ultracentrífuga Beckman.

Después de la centrifugación se recolectó el gradiente y una alícuota de cada fracción se precipitó con ácido tricloroacético (TCA) al 5% y se determinó la radioactividad incorporada en el material TCA insoluble.

PURIFICACIÓN DE VIRUS MARCADO RADIOACTIVAMENTE:

Las monocapas de células MALO4 se lavaron dos veces con PBS y se infectaron con virus SAll. El virus se dejó adsorber durante 1 h. a 37°C en presencia de tripsina (10 µg/ml final). Al término de éste período las células se lavaron con MEM libre de fosfatos y posteriormente se incubaron con MEM libre de fosfatos y 500 uCi de ³²P-ortofosfato (10mCi/ml NEN Corp.).

El cultivo de células infectadas se cosechó después de observar efecto citopático y se extrajo con un volumen igual de trifluorotricloroetano. El virus en la fase acuosa se precipitó con 8% (peso/vol) de polietilenglicol 600 (Union Carbide). El precipitado se resuspendió en 200 µl de solución amortiguadora TSM y se sedimentó en un gradiente continuo de sacarosa (15%-45% en TSM) centrifugando a 24 000 rpm durante 90 min. a 5°C en el rotor SW40 de la ultracentrífuga Beckman. El gradiente se recolectó y una alícuota de cada fracción se precipitó con TCA 5% y se determinó la radioactividad incorporada en el material TCA insoluble, tomando las fracciones correspondientes al virus.

ELECTROFORESIS:

Las fracciones de los gradientes de sacarosa correspondientes

a partículas virales se centrifugaron a 100 000 rpm durante 45 min. en el rotor A100/30 de la ultracentrífuga Airfuge de Beckman. El precipitado resultante se disolvió en solución amortiguadora de muestra de Laemmli (49) y las proteínas se disociaron tratandolas 2 min. en un baño de agua hirviendo.

Los polipéptidos se analizaron por electroforesis en gel de acrilamida-SDS de acuerdo al método descrito por Laemmli (49), (11% peso/vol acrilamida- 0.3% peso/vol bis-acrilamida) utilizando como solución amortiguadora Tris-glicina pH 8.8. Se corrió a 10 mA en el gel concentrador y a 20 mA hasta que el azul de bromofenol salió del gel separador.

Los geles se procesaron para fluorografía de acuerdo al método descrito por Bonner y Laskey (50). Las curvas densitométricas de los fluorogramas se hicieron a 600 nm usando un espectrofotometro Gilford 250 con un transportador lineal Gilford modelo 2410s.

HEMAGLUTINACIÓN:

Una alícuota (50 μ l) de las fracciones de los gradientes de sacarosa correspondientes a partículas virales se utilizó para determinar actividad hemaglutinante.

Se utilizaron diluciones 1:2 en solución amortiguadora

fosfatos-salina pH 7.8 conteniendo albúmina al 0.5%.

Las diluciones se incubaron con un volúmen igual de una suspensión de eritrocitos humanos del grupo 0 al 0.5% en PBS durante 1 h. Los títulos se expresan como el recíproco de la máxima dilución positiva.

RESULTADOS:I. PARTICULAS VIRALES INTRACELULARES EN CÉLULAS INFECTADAS CON SAll.

Los estudios de cinética de crecimiento de SAll en cultivo han mostrado que la producción de virus infeccioso empieza a las 6 h. post-infección, el efecto citopático se detecta a las 8-10 h. y es máximo entre las 24 h. y 48 h. (35,51).

Para determinar que tipo de partículas se encuentran en células infectadas con SAll al final del proceso de infección, se analizaron extractos celulares, marcados con ³⁵S-metionina, por centrifugación en gradientes de sacarosa. Este análisis mostró la presencia en los extractos de dos tipos de partículas con coeficientes de sedimentación de 550S y 450S, aproximadamente (Fig.2). El análisis de los polipéptidos en los dos tipos de partículas encontradas se muestra en la Fig.3; se pudo observar que las partículas de 550S (Fig.3A) corresponden a virus maduro ya que contienen tanto los polipéptidos de capa interna (VP1, VP2 y VP6) como los de capa externa (VP3 y VP7); en cambio, las partículas de 450S (Fig.3B), están formadas por los mismos polipéptidos del virión completo excepto que el polipéptido VP1 se encuentra

en menor proporción y además presentan un polipéptido con la migración electroforética del polipéptido no estructural llamado NCVPl. En la Fig.4 se muestran las curvas densitométricas de los polipéptidos presentes en los dos tipos de partículas descritas, obtenidas de otra preparación.

Las partículas de 550S presentan la densidad del virión y al microscopio electrónico se puede observar que tienen la morfología característica del virus maduro (Luis Padilla, datos no publicados). Las partículas de 450S presentan una densidad de 1.33 g/ml y en el microscopio electrónico aparecen como partículas con capa externa pero vacías, aparentemente sin RNA (Luis Padilla, datos no publicados). Ambas partículas presentaron una actividad hemaglutinante similar.

Las proporciones en que se encuentran los dos tipos de partículas descritas varía en cada preparación y es posible obtener algunos extractos que presentan solo virus completo (550S).

II. PARTÍCULAS VIRALES SINTETIZADAS AL AGREGAR TUNICAMICINA DESDE EL INICIO DE LA INFECCIÓN.

Se ha demostrado en una gran variedad de sistemas que la tunicamicina interfiere en la glicosilación de glicoproteínas sin afectar otros procesos celulares (52,53,54). Para

analizar el efecto de éste antibiótico sobre la formación de virus maduro, se llevó a cabo la infección agregando tunicamicina durante el período de adsorción y manteniendola durante todo el proceso de infección. El análisis de los polipéptidos presentes en los extractos de células infectadas en presencia de tunicamicina mostró que en presencia de este antibiótico solo se lleva a cabo la síntesis de la forma no glicosilada del polipéptido NCVP5 (pNCVP5) (Fig.5). Posteriormente se analizaron por sedimentación las partículas formadas, marcadas con $^{35}\text{[S]}$ -metionina, utilizando como marcador interno virus purificado marcado con $^{32}\text{[P]}$. En éstas condiciones se observó la presencia, en los extractos, de dos tipos de partículas, con coeficientes de sedimentación de 500S y 370S, aproximadamente (Fig.6).

El análisis electroforético de los polipéptidos presentes en cada una de las partículas mostró que las partículas de 500S (Fig.7A) presentan solo los polipéptidos de capa interna (VP1,VP2 y VP6), mientras que las partículas de 370S contienen también los polipéptidos de capa interna (Fig.7B) pero en éstos el polipéptido VP1 se encontró en menor proporción y se pudo observar además el polipéptido de migración igual al polipéptido no estructural NCVP1,

observado en las partículas de 450S en las infecciones sin el antibiótico. En las partículas de 370S se observa también un polipéptido con mayor migración que VP2 el cual ha sido descrito recientemente en la literatura como un producto de degradación de VP2 (55).

Ninguna de éstas partículas presentó actividad hemaglutinante; ambos tipos de partículas corresponden a aquellas observadas en infecciones normales, pero desprovistas de la capa externa, formada por las proteínas VP3 y VP7. La ausencia de partículas con capa externa sugiere que la glicosilación de una o más proteínas virales es indispensable para la adquisición de ésta capa en Sall.

III. PARTÍCULAS VIRALES SINTETIZADAS AL AGREGAR TUNICAMICINA A LAS 2 H. POST-INFECCIÓN.

En algunos experimentos llevados a cabo en el laboratorio se había observado que al agregar tunicamicina después de las 6 h. post-infección no se inhibía la formación de virus maduro, y que éste aparecía con una cantidad del polipéptido VP7 glicosilado aparentemente normal. Sin embargo, cuando la tunicamicina se agregaba a las 2 h. post-infección, también se llevaba a cabo el ensamble de virus completo, pero en éste

caso el virus contenía casi exclusivamente la forma no glicosilada del polipéptido VP7 (pVP7).

En base a éstos datos se llevó a cabo la infección agregando tunicamicina a las 2 h. post-infección, y se analizaron las partículas formadas por centrifugación en gradientes de sacarosa, utilizando como marcador interno virus purificado marcado con ^{32}P (Fig.8). Este análisis mostró que en éstas condiciones se lleva a cabo el ensamble de tres tipos de partículas con coeficientes de sedimentación de 550S, 450S y 370S, la primera de ellas con un coeficiente igual al del virus maduro.

Al determinar la composición de polipéptidos de cada una de éstas partículas, por electroforesis en gel de acrilamida-SDS, se encontró que las partículas de 550S presentan los polipéptidos correspondientes a un virus maduro, pero el polipéptido VP7 se encuentra en su forma no glicosilada (Fig.9). Las partículas de 450S también presentan los polipéptidos del virus completo con la forma no glicosilada de VP7, pero el polipéptido VP1 se encuentra en menor proporción y además presentan el polipéptido de migración igual al polipéptido no estructural MCVPI. En las partículas de 370S solo se encuentran los polipéptidos de capa interna, de éstos

VP1 se encuentra en menor proporción y además presentan el polipéptido de migración igual a NCVPl.

Estos experimentos sugirieron que si se permitía la síntesis de glicoproteínas en las primeras horas de infección se posibilitaba la formación de virus con capa externa, aunque ésta se formase con la proteína no glicosilada del polipéptido VP7.

Para observar en que momento durante la infección aparecen partículas conteniendo la capa externa, se llevó a cabo la infección agregando tunicamicina a las 2 h. post-infección y cosechando posteriormente las células a diferentes tiempos. En la Fig. 10 se muestra que la síntesis de las tres partículas descritas continúa aún en presencia de tunicamicina. Las partículas de 450S se encuentran en mayor cantidad que las de 550S, sin embargo las proporciones de ambas varían en distintas preparaciones.

A éstas partículas se les determinó actividad hemaglutinante encontrando que aunque las partículas con capa externa contienen la forma no glicosilada de VP7, presentan una actividad hemaglutinante específica similar al virión (Tabla 1).

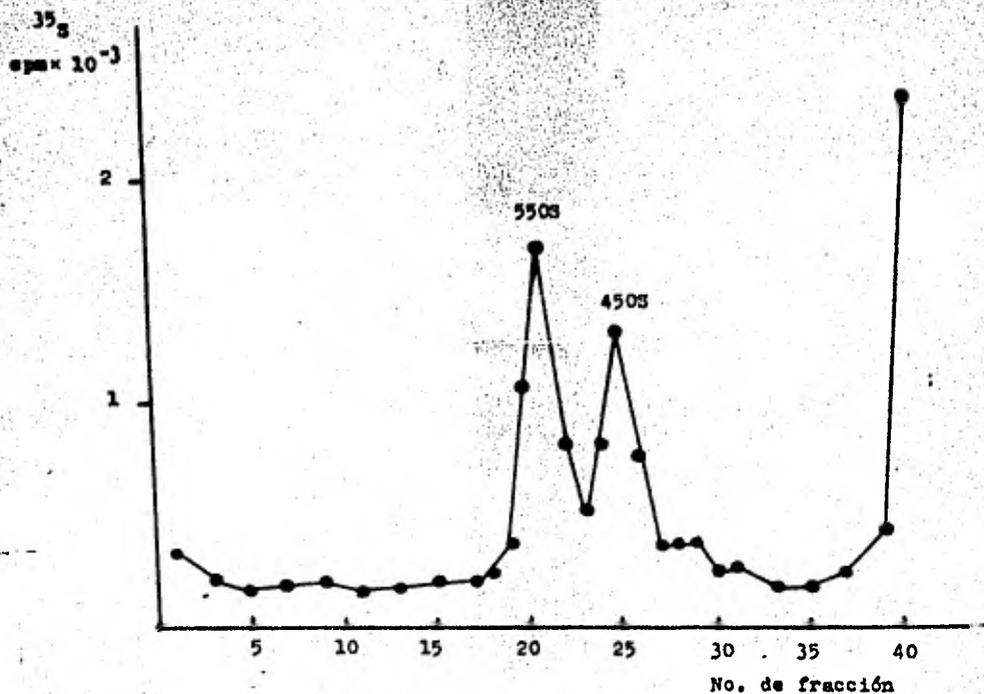


Fig. 2 Purificación de partículas intracelulares marcadas con metionina- s^{35} .

Monocapas de células MA104 se infectaron con 3A11. El virus se dejó adsorber durante 1 h. a 37°C. Después de este período las células se marcaron con metionina- s^{35} y se cosecharon a las 24 h. post-infección. Los extractos celulares, tratados con trifluorotricloroetano, se centrifugaron en un gradiente continuo de sacarosa. Una alícuota de cada fracción se precipitó con TCA 5% y se midió la radioactividad incorporada.



Fig. 3. Electrophoretogram of the 40S and 60S ribosomal subunits of *Escherichia coli* and their respective sedimentation coefficients.

Las fracciones de 40S y 60S se separaron en un 5% de corchano de agar. Las fracciones de 40S se centrifugaron a 100,000 rpm durante 2 horas, 4°C, y se precipitaron, resultando en un 5% de corchano de agar. Las fracciones de 60S se centrifugaron a 100,000 rpm durante 2 horas, 4°C, y se precipitaron, resultando en un 5% de corchano de agar.

- A. Particulas de 40S.
- B. Particulas de 60S.

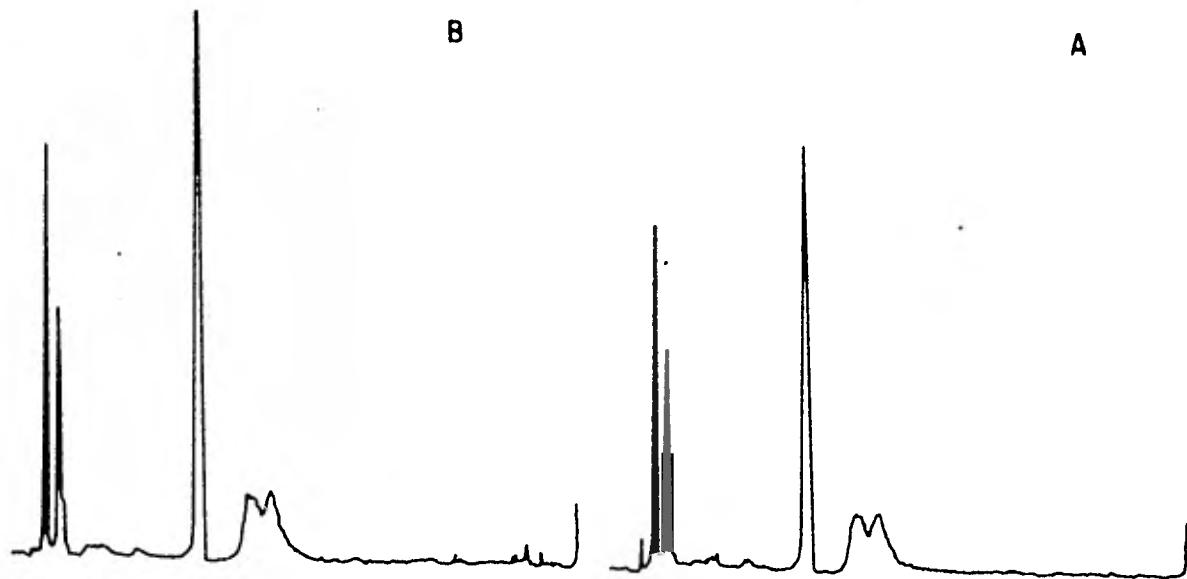


Fig. 4 Curvas densitométricas de la fluorografía de los polipéptidos presentes en las partículas de 550S y 450S

A. Partículas de 550S

B. Partículas de 450S. el polipéptido HCVPI aparece como un hombro en el pico del polipéptido VP1



Fig. 2. Purification of pNCVPS. The DNA was extracted from the cells and purified by the method of Sambrook et al. (1989). The purified DNA was digested with EcoRI and the resulting fragments were separated by agarose gel electrophoresis. The bands were stained with ethidium bromide. Lane A shows the DNA extracted from the cells and Lane B shows the purified pNCVPS. The band labeled NCVPS is the DNA extracted from the cells and the band labeled pNCVPS is the purified plasmid DNA.

1. The DNA was extracted from the cells and purified by the method of Sambrook et al. (1989).

2. The purified DNA was digested with EcoRI and the resulting fragments were separated by agarose gel electrophoresis.

3. The bands were stained with ethidium bromide.

4. Lane A shows the DNA extracted from the cells and Lane B shows the purified pNCVPS.

5. The band labeled NCVPS is the DNA extracted from the cells and the band labeled pNCVPS is the purified plasmid DNA.

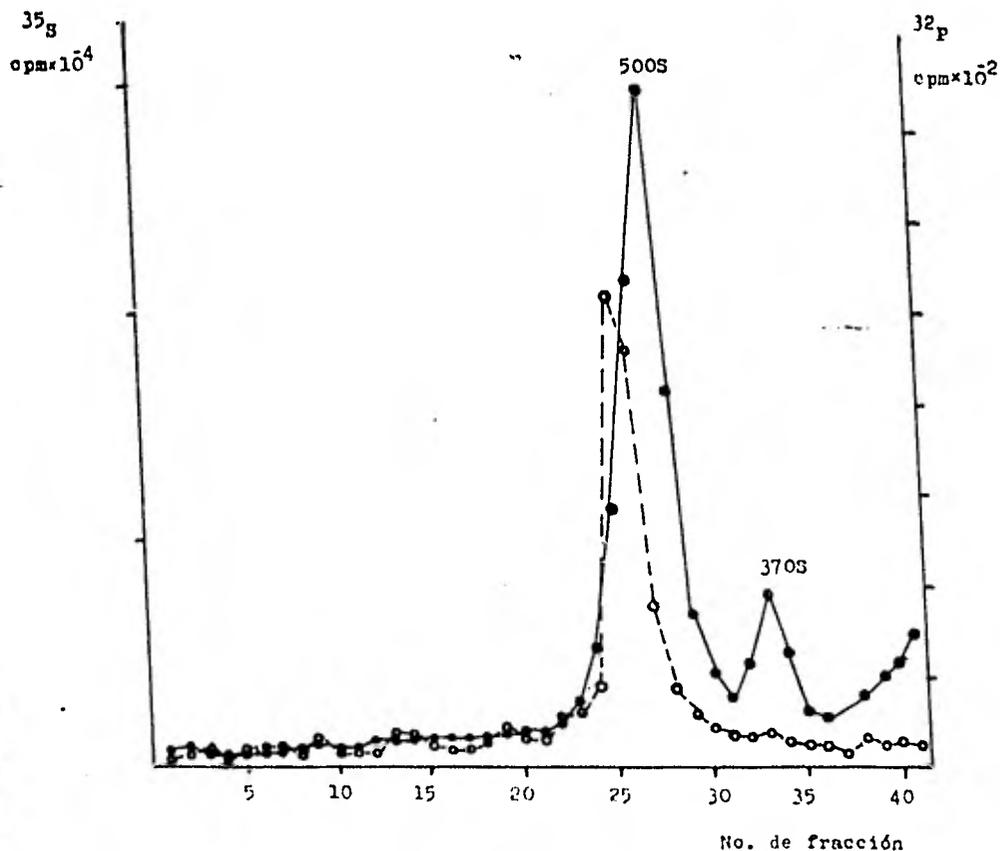


Fig. 6 Efecto de la tunicamicina en el ensamble de partículas virales.

Se agregó tunicamicina al medio durante el período de adsorción y de infección con BAll. Las células se marcaron con metionina- ^{35}S después del período de adsorción y se cosecharon a las 24 h. post-infección. Los extractos celulares se centrifugaron en un gradiente continuo de sacarosa utilizando como marcador virus purificado marcado con ^{32}P . Una alícuota de cada fracción se precipitó con TCA y se midió la radioactividad incorporada. ●-● ^{35}S ○-○ ^{32}P

A

B



Fig. 7 Fluorografía de un gel de agarosa de 1% en partículas virales, preparadas en el laboratorio de síntesis de proteínas de la Universidad de California.

Las fracciones de ultracentrifugación de la muestra 1a y 1b correspondientes a las fracciones 1 y 2 se centrifugaron a 100,000 rpm en un rotor de 10 cm y el precipitado resultante se disolvió en 0.5 ml de acetato de etilo y se sometió a un análisis de autoradiografía por Jassby (14).

- A. Partículas de virus
- B. Partículas de virus

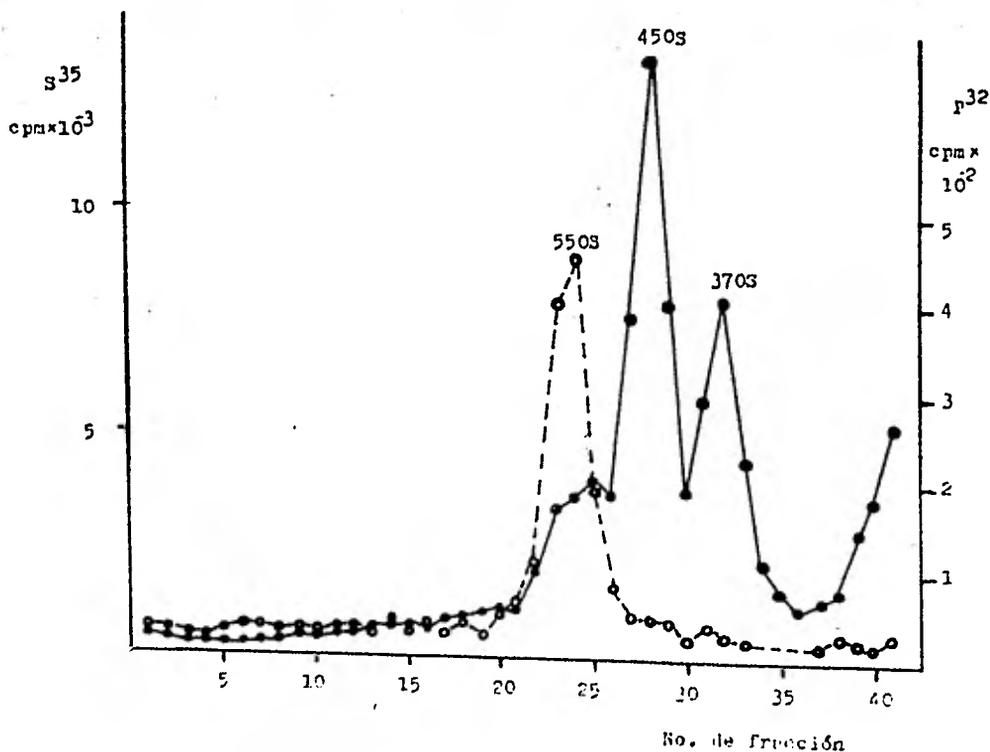


Fig. 8 Purificación de partículas intracelulares sintetizadas al agregar tunicamicina a las 2 h. post-infección. La tunicamicina se agregó a las células infectadas a las 2 h. post-infección. Las células se marcaron con metionina- ^{35}S después del período de adsorción y se cosecharon a las 24 h. post-infección. Los extractos celulares tratados con trifluorotribromotano se centrifugaron en un gradiente continuo de sacarosa, utilizando como marcador virus purificado marcado con ^{32}P . Una alícuota de cada fracción se precipitó con TCA 5% y se midió la radioactividad incorporada.

●● ^{35}S
 ○○ ^{32}P



Fig. 9 Fluorografía de un gel de acrilamida de partículas vacuolas, marcada con ^{35}S -metionina, sintetizadas en presencia de un inhibidor de la síntesis de proteínas, 2 h. post-integración.

Las fracciones del experimento descrito en la fig. 6 correspondientes a partículas de vacuolas se centrifugaron a $10^5 \times g$ durante 1 h y el precipitado resultante se sometió a electroforesis en gel de acrilamida en el método de Laemmli (8).

- A. Partículas de vacuolas sintetizadas en presencia de un inhibidor de la síntesis de proteínas
- B. Partículas de vacuolas sintetizadas en presencia de un inhibidor de la síntesis de proteínas

Fig. 10 Síntesis de partículas intracelulares en presencia de tunicamicina (2 h. post-infección)

Las células infectadas se marcaron con ^{35}S -metionina después del período de adsorción. La tunicamicina se agregó al medio a las 2 h. post-infección y el virus se cosechó en cultivos independientes a los tiempos indicados. Los extractos celulares tratados con trifluorotricloroetano se analizaron como se describió en la Fig. 2

A. 6 h. post-infección

B. 10 h. post-infección

C. 24 h. post-infección

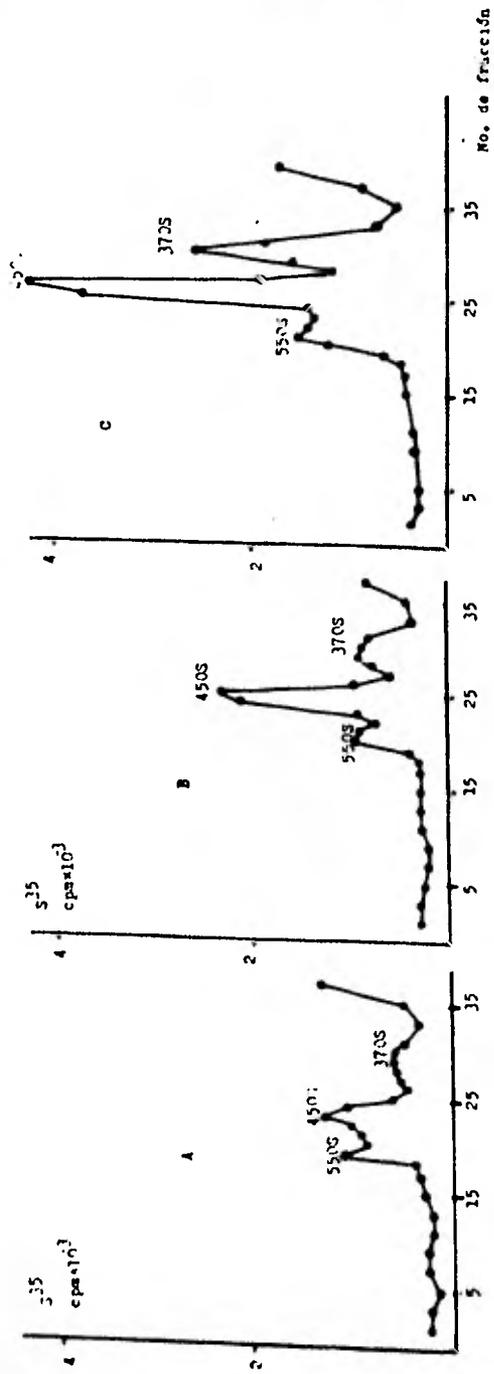


Fig. 10

Tabla I

Actividad hemaglutinante de las partículas virales sintetizadas en ausencia (-) y presencia (+) de tunicamicina agregada a las 2 h. post-infección.

PARTICULA	ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE UHA/CFM
550S	+ .0021 - .0027
450S	+ .0014 - .0036
370S	0

Una alícuota de las fracciones de los gradientes de sacarosa de la Fig.2 y la Fig.8 correspondientes a partículas virales se utilizó para determinar actividad hemaglutinante.

UHA unidades hemaglutinantes

DISCUSIÓN:

El estudio llevado a cabo tuvo por objeto explorar la posible importancia de las glicoproteínas virales en el ensamble y replicación del virus SAll.

Existen un gran número de evidencias de que la glicosilación de las glicoproteínas virales se requiere para la formación de distintos virus con envoltura lipídica (44,45,46,47,48).

Los rotavirus por ser los únicos virus conocidos sin envoltura lipídica que contienen glicoproteínas con enlaces N-glicosídicos, son un modelo interesante para el estudio del papel de éstas glicoproteínas en el ensamble de los virus y explorar las bases químicas que le confieren un comportamiento distinto a las glicoproteínas encontradas en los virus con envoltura lipídica.

En este estudio se llevó a cabo el análisis de partículas intracelulares presentes al final de la infección y se estudió el efecto de la inhibición de la glicosilación sobre la producción de las partículas encontradas.

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que en células infectadas con SAll se pueden producir cuatro tipos de partículas:

I. virus maduro (550S)

II. virus sin capa externa (500S)

III. partículas aparentemente vacías (sin RNA), con composición de polipéptidos similar al virus maduro, que presentan el polipéptido VP1 en menor proporción, y además un polipéptido con migración igual al polipéptido no estructural NCVPl (450S).

IV. partículas sin capa externa, aparentemente vacías que presentan el polipéptido VP1 en menor proporción, y además contienen el polipéptido con migración electroforética igual a NCVPl (370S). Estas corresponden a las partículas de 450S (III) sin capa externa.

Las partículas de 450S y 370S no habían sido descritas anteriormente en la literatura. La proporción en que se encuentran es muy variable y pueden aun estar ausentes en algunas preparaciones. Es difícil, con los datos hasta ahora obtenidos, decir si éstas partículas juegan algún papel en la síntesis viral o si se tratan de partículas defectivas. El polipéptido NCVPl ha sido descrito recientemente en la literatura como un producto de degradación de VP2 (55). Para descartar si en las partículas se encuentra presente NCVPl o si éste en realidad es un producto de degradación de VP2 es necesario determinar la identidad de ésta proteína por

otros métodos como análisis de los productos de hidrólisis por proteasas.

Hemos encontrado que al inhibir la glicosilación solo se lleva a cabo el ensamble de partículas sin capa externa (500S y 370S). Estas partículas no presentan actividad hemaglutinante lo cual va de acuerdo con los estudios donde se observó que un componente de la capa externa es el responsable de la hemaglutinación (26). De acuerdo a los estudios de microscopía electrónica (32,33,34,35,36), aparentemente las partículas virales adquieren la capa externa a través de un proceso de gemación al entrar al lumen del retículo endoplásmico. La tunicamicina posiblemente inhibe el paso de éstas partículas a retículo endoplásmico (como consecuencia de la inhibición de la glicosilación) que probablemente se acumularían en citoplasma.

La observación que sin embargo nos parece más interesante es que es suficiente que se permita la glicosilación durante un tiempo corto al inicio de la infección, para que ocurra el ensamble de partículas con capa externa, aunque en éstas solo se observe la forma no glicosilada del polipéptido VP7, y que, la síntesis de éstas partículas continúa en estas condiciones en presencia de tunicamicina, sugiriendo una

posible acción catalítica de las glicoproteínas virales. Sin embargo con los datos hasta ahora obtenidos no es posible determinar si esta posible acción catalítica se debe a VP7 o a alguna de las glicoproteínas no estructurales (NCVP5 o NCVP6).

Las partículas ensambladas con la forma no glicosilada de VP7 presentan actividad hemaglutinante, por lo que la glicosilación en éstos virus no es un requerimiento para la expresión de ésta actividad.

Se puede concluir que en SAll la glicosilación, al menos al inicio de la infección, es imprescindible para la formación de capa externa y por tanto de virus infeccioso. Es posible que la glicosilación de las proteínas virales se requiera para modificar la membrana del retículo endoplásmico y permitir así la gemación del virus hacia el lumen del retículo. Probablemente no se requiere que todas las moléculas de VP7 se encuentren glicosiladas para que se complete la maduración del virus ya que aún en preparaciones de virus purificado obtenidas en ausencia de tunicamicina se puede observar el precursor no glicosilado de VP7 (pVP7).

El bloqueo de la formación de partículas con capa externa al inhibir la glicosilación al inicio de infección puede

deberse a diferentes razones como las mencionadas para virus con envoltura (agregación, degradación, etc. de la glicoproteína). Sin embargo, es posible agregar que el mecanismo de inhibición no parece deberse a un defecto en las glicoproteínas no glicosiladas que forman el virus porque al permitir la síntesis de glicoproteínas al inicio de la infección, la síntesis de partículas virales con capa externa continúa después de inhibir posteriormente la glicosilación. Estos dos últimos puntos serán motivo de estudios futuros en el laboratorio.

BIBLIOGRAFIA.

1. Mc. Nulty, M.S. (1978). Rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 40: 1-18.
2. Holmes, I.H. (1979). Viral Gastroenteritis. *Prog. Med. Virol.* 25: 1-36.
3. Flewett, T.H., y Woode, G.N. (1978). The rotaviruses. *Arch. of Virol.* 57: 1-23.
4. Light, J.S., y Hodes, H.L. (1943). Studies on epidemic diarrhoea of the newborn: isolation of a filtrable agent causing diarrhoea in calves. *Am. J. publ. Hlth.* 33: 1451-1454.
5. Mebus, C.A. , Underdahl, N.R. , Rhodes, M.B. y Twiehaus, M.J. (1969). Calf diarrhoea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. *Univ. Neb. Agric. Exp. Station. Res. Bull.* 233: 1-46.
6. Bishop, R.P., Davidson, G.P., Holmes, I.H. y Ruck, B.J. (1973). Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* ii 1281-1283.
7. Mc. Nulty, M.S. , Pearson, E.R., Mc. Ferran, J.B., Collins, D.S. y Allan, A.M. (1976). A reovirus- like agent (rotavirus) associated with diarrhoea in neonatal pigs. *Vet. Microbiol.* 1: 55-63.
8. Lecoe, J.G. , King, M.T. y Luck, R. (1976). Reovirus-like agent associated with fatal diarrhoea in neonatal pigs. *Infect. and Immun.* 14: 816-825.

9. Flewett, T.H., Bryden, A.J. y Davies, H. (1975). Virus diarrhoea in foals and other animals. *Vet. Res.* 96: 477.
10. Flewett, T.H., Bryden, A.S. , Davies, H., Woode, G.N. Bridger, S.O. y Derrick, J.M. (1974). Reaction between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* ii 61-63.
11. Lecatsas, G.(1972). Electron microscopic and serological studies on simian virus SALL and the 'related' O agent. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research.* 39: 133-138.
12. Els, H.J., Lecatsas, G. (1972). Morphological studies on simian virus SALL and the 'related' O agent. *J. Gen Virol.* 17: 129-132.
13. Kraft, L.M. (1958). Observations on the control and natural history of epidemic diarrhoea of infant mice (EDIM). *Yale J. Biol. Med.* 31: 121-137.
14. Palmer, E.L., Martin, M.Lly Murphy, F.A. (1977). Morphology and stability of infantile gastroenteritis virus: comparison with reovirus and blue-tongue virus. *J. Gen. Virol.* 35: 403-414.
15. Mc. Nulty, M.S., Allan, G.M., Pearson, G.R. Mc. Ferran, J.B., Curran, W.L. y Mc. Cracken, R.M. (1976). Reovirus-like agent (rotavirus) from lambs. *Infect. and Imm.* 14: 1332-1338.
16. Woode, G.N., Bridger, J.C., Jones, J.M., Flewett, T.H. Bryden, A.S., Davies, H.A. y White, G.B.B. (1976). Morphological and antigenic relationships between viruses (rotaviruses) from acute gastroenteritis of children, calves piglets, mice and foals. *Infect. and Imm.* 14: 804-810.

17. Rodger, S.M., Schnagl, R.D. y Holmes, I.H. (1975).
Biochemical and biophysical characteristics of diarrhoea
viruses of human and calf origin. *J. of Virol.* 16: 1229-1235.
18. Newman, J.F.E., Brown, F., Bridger, J.C. y Woode, G.N.
(1975) Characterization of a rotavirus. *Nature (london)* 258: 631-633
19. Holmes, I.H., Bishop, R.F. y Davidson, G.P. (1975).
Infantile enteritis viruses: morphogenesis and morphology. *J. of
Virol.* 16: 937-943.
20. Rodger, S.M., Schnagl, R.D. y Holmes, I.H. (1977).
Further biochemical characterization, including the detection
of surface glycoproteins of human, calf and simian rotaviruses.
J. of Virol. 24: 91-98.
21. Thouless, M.E. (1979). Rotavirus Polypeptides. *J. Gen. Virol.*
44: 187-197.
22. Kalica, A.R., Theodore, T.S. (1979). Polypeptides of simian
rotavirus (SAll) determined by a continuous polyacrilamide
gel electrophoresis method. *J. Gen. Virol.* 43: 463-466.
23. Espejo, R.T., Martínez, E., López, S., y Muñoz, O. (1980).
Different polypeptide composition of two human rotavirus types.
Infect. and Imm. 28: 351-354.
24. Cohen, J. (1977). Ribonucleic acid polymerase activity
associated with purified calf rotavirus. *J. Gen. Virol.*
36: 395-402.
25. Mason, B.B., Graham, D.Y., y Estes, M.K. (1980). In vitro
transcription and translation of simian rotavirus SAll gene
products. *J. of Virol.* 33: 1111-1121.

26. Inaba, Y., Sato, K., Takahashi, E.E., Kurogi, H., Satoda, K., Omori, T. y Matumoto, M. (1977). Hemagglutination with Nebraska calf diarrhoea virus. *Microbiology and Immunology*. 21: 531-534.
27. Schoub, B.D., Lecatsas, G. y Prozesky, O.W. (1977). Antigenic Relationships between human and simian rotaviruses. *J. Med. Microbiol.* 10: 1-6.
28. Thouless, M.E., Bryden, A.S., Flewett, T.H., Woods, E.W., Bridger, J.C., Snodgrass, D.R. y Herring, J.C. (1974). Serological relationships between rotaviruses from different species as studied by complement fixation and neutralization. *Arch. Virol.* 53: 287-294.
29. Spence, I., Fauvel, M., y Petro, R. (1978). Comparison of rotavirus strains by hemagglutination inhibition. *Can. J. of Microbiol.* 24: 353-356.
30. Fauvel, M., Spence, I., Babiuk, L.A., Petro, R. y Bloch, S. (1978). Hemagglutination and hemagglutination inhibition with a strain of Nebraska calf diarrhoea virus (bovine rotavirus). *Intervirology*. 9: 95-105.
31. Flewett, T.H. y Bryden, A.S. (1976). Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* ii. 61-63.
32. Esparza, J., Gorziglia, F., Gil, F. y Römer, H. (1980). Multiplication of human rotavirus in cultured cells : an electron microscopic study. *J. Gen. Virol.* 47: 461-472.
33. Altenburg, C.B., Graham, D.Y., y Esteu, M.K. (1980). Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells.

J. Gen. Virol. 46: 75-85.

34. Mc. Nulty, M.S., Curran, W.L. y Mc.Ferran, J.B. (1976). The morphogenesis of a cytopathic bovine rotavirus in Madin-Darby bovine kidney cells. J. Gen. Virol. 33: 503-508.

35. Estes, M.K., Graham, D.Y., Gerba, C.P., Smith, E.M. (1979). Simian rotavirus SAll replication in cell cultures. J. Virol. 31: 810-815.

36. Chasey, D. (1977). Different particle types in tissue culture and intestinal epithelium infected with rotavirus. J. Gen. Virol. 37: 443-451.

37. Wyatt, R.G., James, W.D., Bohl, E.H., Tneil, K.W., Saef, L.J. Kalica, R.A., Greenberg, H.B., Kapikian, A.Z. y Chanock, R.M. (1980). Human rotavirus type 2: cultivation in vitro. Science. 207: 189-190.

38. Espejo, T.R., López, S. y Arias, C. (1981). Structural polypeptides of simian rotavirus SAll and the effect of trypsin. J. Virol. 37: 156-160.

39. Arias, C., López, S. y Espejo, T.R. (1981). Gene protein products of SAll simian rotavirus genome. J. Virol. (en prensa).

40. The Biochemistry of Glycoproteins and proteoglycans. Edited by William J. Lenarz. (1980). Plenum Press, New York.

41. Rothman, J.E., Fine, R.E. (1980). Coated vesicles transport newly synthesized membrane glycoproteins from endoplasmic reticulum to plasma membrann y two successive stages. Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 780-784.

42. Fries, E., Rothman, J.E. (1980). Transport of vesicular stomatitis virus glycoprotein in a cell free extract. Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 3870-3874.
43. Takatsuki, A., Arma, K.Y., Tamura, G. (1971). Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin. J. Antibiot. 24:215-233.
44. Gibson, R., Schelsinger, S y Kornfeld, S. (1979). The nonglycosylated glycoprotein of vesicular stomatitis virus is temperature-sensitive and undergoes intracellular aggregation at elevated temperatures. J. Biol. Chem. 254: 3600-3607.
45. Gibson, R., Leavitt, R., Kornfeld, S. y Schlesinger, S. (1978). Synthesis and infectivity of vesicular stomatitis virus containing nonglycosylated G protein. Cell. 13: 671-679.
46. Schwarz, R.T., Rohrschneider, J.M. y Schmidt, F.G. (1976). Suppression of glycoprotein formation of Semliki Forest, Influenza and Avian Sarcoma virus by tunicamycin. J. Virol. 19: 762-791.
47. Leavitt, R., Schlesinger, S. y Kornfeld, S. (1977). Tunicamycin inhibits glycosylation and multiplication of Sindbis and Vesicular Stomatitis viruses. J. Virol. 21: 375-385.
48. Nakamura, K. y Compans, R.W. (1976). Effects of glucosamine 2-deoxyglucose and tunicamycin on glycosylation and assembly of influenza viral proteins. Virology. 64:303-319.

49. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*. 227: 680-685.
50. Bonner, W.M. y Laskey, R.A. (1974). A film detection method for tritium labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46: 83-88.
51. Matsuno, S. y Mukoyama, A. (1979). Polypeptides of bovine rotavirus. *J. Gen. Virol.* 33: 1111-1121.
52. Takatsuki, A., Khono, K. y Tamura, G. (1975). Inhibition of synthesis of polisoprenol sugars in chick embryo microsomes by tunicamycin. *Agr. Biol. Chem.* 39: 2089-2091.
53. Takatsuki, A., y Tamura, G. (1971). Effect of tunicamycin on the synthesis of macromolecules in culture of chick embryo fibroblasts infected with newcastle disease virus. *J. Antibiot.* 24: 785-794.
54. Takatsuki, A., Shimizu, K.I. y Tamura, G. (1971). Effect of tunicamycin on microorganisms: morphological changes and degradation of RNA and DNA induced by tunicamycin. *J. Antibiot.* 25: 75-85.
55. Estes, M.K., Graham, D.Y. y Mason, B.B. (1981). Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J. Virol.* 3: 879-888.