



ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

IZTACALA U. N. A. M.

CARRERA DE BIOLOGIA

**“ANALISIS DE PROTEINAS EN NUCLEOS AISLADOS
DE CELULAS HELA BAJO INFECCION CON
EL VIRUS DE LA POLIOMIELITIS”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
MA. EUGENIA NUÑEZ VALDEZ

SAN JUAN IZTACALA. MEXICO 1985

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO DE GENETICA
Y BIOLOGIA MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y
ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN, BAJO LA DIRECCION DEL
DR. CARLOS FERNANDEZ TOMAS

AGRADECIMIENTOS

AGRADEZCO AL DR. CARLOS FERNANDEZ TOMAS POR SU AYUDA Y
DIRECCION EN LA ELABORACION DE ESTE TRABAJO

A AURELIO DIAZ POR SUS CONSEJOS Y COLABORACION EN EL
DESARROLLO EXPERIMENTAL

A SERGIO GONZALEZ, IGNACIO PEÑALOSA, ABEL FUENTES Y
MARTHA SALCEDO POR LA REVISION DEL MANUSCRITO

Y A TODOS LOS QUE DE ALGUNA MANERA PARTICIPARON EN LA
ELABORACION DE ESTE TRABAJO

A MIS PADRES

I N D I C E

	Pag.
- Lista de abreviaturas_ _ _ _ _	1
- Introducción_ _ _ _ _	2
a.) Virus de la poliomielitis_ _ _ _ _	3
a.1.) La estructura_ _ _ _ _	3
a.2.) El genoma_ _ _ _ _	4
a.3.) Replicación_ _ _ _ _	5
a.4.) Ciclo de multiplicación viral_ _ _ _ _	10
a.4.1.) Adsorción, desencapsidación y penetración	10
a.4.2.) Alteración de las funciones del huésped_	12
a.4.3.) Síntesis de proteínas virus específicas_	13
a.4.4.) Ensamblaje del virus y liberación del mismo_ _ _ _ _	17
b.) Inhibición de la síntesis de proteínas_ _ _ _ _	20
b.2.) Inhibición de la síntesis de DNA_ _ _ _ _	22
b.3.) Inhibición de la síntesis de RNA_ _ _ _ _	24
c.) Presentación del trabajo_ _ _ _ _	30
 - Materiales	
A.) Células_ _ _ _ _	33
B.) Virus_ _ _ _ _	33
C.) Medios de cultivo_ _ _ _ _	33
D.) Precursores radioactivos_ _ _ _ _	35
E.) Reactivos y otros materiales_ _ _ _ _	35
F.) Soluciones_ _ _ _ _	37
G.) Composición de otros materiales_ _ _ _ _	41

	Pag.
- Métodos _____	42
a.) Cultivo y crecimiento de células HeLa _____	43
b.) Infección con el virus de la Poliomielitis- (poliovirus) _____	43
c.) Síntesis de RNA durante infección viral _____	44
d.) Cuantificación de proteína por el Método de Lowry _____	45
e.) Marcaje e incorporación de Metionina ³⁵ S a cé- lulas HeLa _____	45
f.) Aislamiento de núcleos _____	45
g.) Obtención del extracto nuclear _____	46
h.) Electroforesis de una sola dimensión en geles- de acrilamida (EGA-SDS) (Gel en placa) _____	47
i.) Electroforesis de doble dimensión en geles de- acrilamida (EGA-DD) _____	49
j.) Tinción de geles _____	52
k.) Autorradiografía de geles _____	53
l.) Densitometría de los autorradiogramas _____	53
m.) Procesamiento del tubo de diálisis _____	53
n.) Obtención de pesos moleculares _____	53
- Resultados _____	55
a.) Síntesis de RNA en células HeLa infectadas con- el virus de la Poliomielitis _____	56
b.) Proteína nuclear asociada a cromatina en célu- las infectadas _____	59
c.) Proteína solubilizada en 0.4 M NaCl en núcleos-	

	Pag.
aislados de células control_ _ _ _ _	63
d.) Análisis de proteínas nucleares en electroforesis- de doble dimensión_ _ _ _ _	64
e.) Localización de PAD-35 en el citoplasma_ _ _ _ _	67
f.) Pc35 y su posible relación con la transcripción_ _	72
- Discusión_ _ _ _ _	84
- Referencias_ _ _ _ _	90

L I S T A D E F I G U R A S

Figura	Pag.
1.) Complejo de replicación de RNA viral_ _ _ _ _	7
2.) Genoma de polio dividido en dos regiones_ _ _	15
3.) Síntesis de RNA en células HeLa infectadas con polio_ _ _ _ _	57
4.) Autorradiograma de las proteínas asociadas a cromatina después de extracción de núcleos con 0.4 M NaCl_ _ _ _ _	61
5.) Autorradiograma de las proteínas solubiliza- das de la cromatina con 0.4 M cloruro de so- dio_ _ _ _ _	65
6.) Análisis en geles bidimensionales, de las proteínas solubilizadas con 0.4 M cloruro de sodio_ _ _ _ _	68
7.) Autorradiograma del análisis bidimensional- de proteínas asociadas a la cromatina de cé- lulas infectadas después de extracción con 0.4 M cloruro de sodio_ _ _ _ _	70
8.) Autorradiograma del análisis bidimensional- de proteínas de localización citoplasmática_	73
9.) Presencia de Pc35 a diferentes tiempos de infección viral_ _ _ _ _	77
10.) Ensayo densitométrico de las proteínas so- lubilizadas en núcleos_ _ _ _ _	79
11.) Correlación entre disminución de Pc35 y su-	

	Pag.
presión de síntesis de RNA en células infecta-	
das _ _ _ _ _	81

- Tablas

1.) Porcentaje de disminución de Pc35 en relación	
a Pc38 a 0 y 2 horas postinfección_ _ _ _ _	83

Lista de Abreviaturas

- BSA- Albúmina de suero de bovino
- cels.- Células
- cpm- Cuentas por minuto
- Doc- Desoxicolato de sodio
- DNA- Acido desoxiribonucleico
- DTT- Ditiotreititol
- EDTA- Acido etilén-diamino-tetracético
- EGA-SDS- Geles de acrilamida-duodecil sulfato de sodio
- Hepes- Acido N-2etanosúlfónico-N'-2-hidroxiethylpiperazina
- Lab.- Laboratorio
- mdi- Multiplicidad de infección
- MEM- Medio mínimo esencial
- nm- Nanómetro
- NP40- Detergente nonidet P40
- OVO- Ovoalbúmina
- P.M.- Peso molecular
- PMSF- Floruro de fenil metil-sulfonilo
- pol.II- Polimerasa II
- PPO- 2,5-difeniloxazol
- RNA- Acido ribonucleico
- rpm- Revoluciones por minuto
- SAE- Solución amortiguadora de extracción
- SDS- Doudecil sulfato de sodio
- sol.- Solución
- TCA- Acido tricloroacético
- Tris-HCl- Trizma hidrocioruro
- Tris-Base- Trizma base

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

a) Virus de Poliomiелitis.

El virus de Poliomiелitis pertenece a la familia Picornaviridae, género Enteroviruses (Rekosh, 1977). Los estudios acerca del virus fueron motivados cuando se mostr6 que la poliomiелitis paralitica era causada por el virus. Las investigaciones llevadas a cabo tenian como finalidad desarrollar vacunas efectivas.

Posteriormente al desarrollo de tales vacunas, las investigaciones fueron conducidas hacia estudios detallados en Biología Molecular, ya que presenta características convenientes para ser trabajado en laboratorio. El virus de la Poliomiелitis se encuentra entre los virus animales más pequeños y simples que se conocen, es muy estable y relativamente fácil de purificar. Además se propaga rápidamente en células en cultivo (Rekosh, 1977).

Estas ventajas han sido motivo para ser utilizado como un sistema modelo, o como un "instrumento" en estudios de mecanismos moleculares de expresión genética tanto de procedencia viral como celular.

a.1.) La estructura.

Fotomicrografías electrónicas del virus, utilizando técnicas de teñido negativo y de rotación, sugieren que el virus es una partícula simétrica icosaédrica, aproximadamente de 28 a 30mn de diámetro con 42 unidades morfológicas, posiblemente con 30 exá

meros y 12 pentámeros (Agrawal, 1966) que hace un total de 240 - unidades estructurales o polipéptidos que constituyen la cápside (Rueckert, 1976).

La partícula viral tiene un peso molecular de 6.8×10^6 daltones y contiene 25% de ácido ribonucleico y 75% de proteína (Schaffer, 1959). El RNA es una molécula de cadena sencilla con un peso molecular entre 2.5×10^6 y 2.8×10^6 daltones con 7500-nucleótidos (Baltimore, 1969; Rueckert, 1971).

El virus de la polio tiene cuatro proteínas estructurales denominadas VP1, VP2, VP3 y VP4, con pesos moleculares de -- 35,000, 28,000, 24,000 y de 6 a 8,000 daltones respectivamente - (Maizel y Summers, 1968), representadas en una sola copia por unidad estructural.

a.2.) El genoma.

El genoma del virus consiste en una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva, esto es, la misma que el RNA mensajero viral.

Por estudios con microscopía electrónica se ha calculado que la molécula de RNA tiene un peso molecular de 2.6×10^6 - daltones que corresponde aproximadamente a 7,500 nucleótidos (Baltimore, 1969; Rueckert, 1971), existiendo diferencias estructurales en cuanto al RNA genómico, (RNA_v), esto es, al RNA contenido dentro de la partícula del virus y al RNA asociado a los polirribosomas de las células infectadas (RNA_m) (Reckosh, 1977). Entre las

semejanzas se sabe que ambos son lineales con una secuencia de 50 a 125 residuos de ácido adenílico (Poli A) adyacente al extremo - 3' (Spector y Baltimore, 1975).

Utilizando Ribonucleasa H para remover selectivamente - el segmento de Poli (A), se observó que la reducción en el tamaño de este segmento, reduce significativamente la infectividad del - virus, indicando que Poli (A) es necesario para la infectividad - (Spector y Baltimore, 1974).

Entre las diferencias, el RNAv está unido por el extremo 5' terminal, a una proteína de bajo peso molecular conocida como VPg (Rothberg y cols., 1978; Ambros y cols., 1978; Baron y Baltimore, 1982; Lee y cols., 1977), sin embargo, es infectivo y actúa como RNA mensajero "in vitro", para la síntesis de proteína - virus-específica y como templado en la replicación de ARN viral.

En lo que respecta al RNAm, existe evidencia en apoyo - de la presencia de fosfato-uridina-fosfato (pUp) en su extremo 5' (Fernández-Muñoz y Darnell, 1976; Nomoto y cols., 1976). Esto lo hace diferente a todos los mensajeros de origen celular y algunos de origen viral, ya que en éstos el extremo 5', consiste en un residuo 7-metilguanosina, conocido como "cap" (Abraham y cols., - - 1975; Wei y Moss, 1975). Esta estructura es esencial para la traducción del mensaje en muchos casos (Both y cols., 1975; Rose y - Lodish, 1976). De esta forma el virus de la polio se traduce sin el residuo 7-metilguanosina en el extremo 5' (Rekosh, 1977).

a.3.) Replicación.

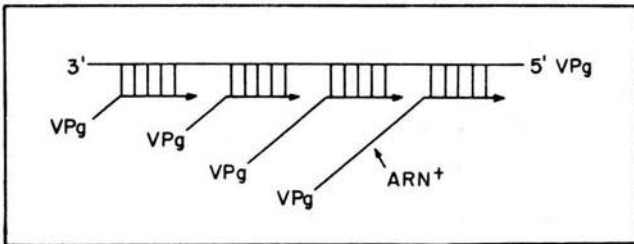
La síntesis de de proteína viral y de RNA y todos los - pasos que conducen a la formación del virus maduro se llevan a cabo en el citoplasma de la célula (Levintow, 1974).

Por estudios cinéticos se ha demostrado que el proceso - de replicación comienza aproximadamente entre los 30 y 60 minutos de iniciada la infección. Sigue una tasa exponencial de 3 a 4 ho-- ras y posteriormante la síntesis se hace lineal (Baltimore, 1969; Darnell, 1967). Paulatinamente va disminuyendo hasta parar completamente entre las 7 y 8 horas postinfección. Debe existir algún - mecanismo regulador que determine si una nueva molécula de RNA - será utilizada para traducción, para transcripción, o para encapsidación (Reckosh, 1977).

Se ha definido una estructura llamada complejo de replicación, esto es, el sitio de síntesis de RNA viral (Girard y cols. 1967). Este complejo es un agregado de RNA que se conoce como "intermediario replicativo", el cual consiste en una cadena sencilla de RNA (-) y cuatro cadenas parcialmente completadas de RNA genómico (+), que se están sintetizando, es decir, es una combinación-de RNA de doble cadena y de cadena sencilla (ver Fig.1). El complejo de replicación es una ribonucleoproteína, dado que contiene a - la RNA polimerasa viral. Estos complejos están asociados con es-- tructuras membranosas (Baltimore, 1964; Caliguirí y Tamm, 1970; Gi-- rard y cols. 1967; Penman y cols., 1964) y existe la posibilidad de que un factor unido a las membranas esté involucrado en la síntesis de cadenas sencillas de RNA (Etchinson y Ehrenfeld, 1981).

Hay evidencia en favor de la existencia de dos tipos de

Fig.1. Complejo de replicación de RNA viral. Conocido como "Intermediario Replicativo" que consiste de una cadena complementaria (RNA⁻) y cuatro cadenas de RNA (+). La iniciación de la replicación involucra la proteína VPg unida al extremo 5' del RNA.



Intermediario Replicativo, uno involucrado en la síntesis de cadenas complementarias (-) y el otro involucrado en la síntesis de - cadenas (+) de la misma polaridad que el RNA mensajero viral (Levintow, 1974), el cual al igual que el RNA mensajero celular se - encuentra asociado al ribosoma.

La iniciación de la Replicación de RNA_v, ya sea de cadena (+) o de cadena (-), involucra la proteína VPg, ya mencionada anteriormente, polipéptido de 22 residuos de aminoácidos, covalentemente unido al extremo 5' del RNA (Ambrose y Baltimore, 1978; - Rothberg y cols., 1978; Wimmer, 1979).

VPg es removida del RNA destinado para ser RNA_m, aparentemente por una enzima celular (Ambros y Baltimore, 1980). No es tá claro si VPg es esencial para una traducción eficiente o si - tiene alguna otra función en el ciclo de vida viral (Strauss y - Strauss, 1983).

Se ha reportado también, que la replicación o la transcripción del RNA viral es catalizada por una enzima virus-específica (Replicasa o RNA polimerasa viral) y por una proteína de origen celular, esenciales para la replicación (Baron y Baltimore, - 1982; Dasgupta, 1983 a, b). Se cree que este factor de origen celular está involucrado en la iniciación de la síntesis de cadenas de RNA (-) a partir de cadenas (+), siendo éste el primer evento en la replicación (Dasgupta, 1980) y que la RNA polimerasa viral está involucrada en la elongación de las cadenas (Semler y cols., 1983).

a.4.) Ciclo de Multiplicación Viral.

a.4.1) Adsorción, desencapsidación y penetración.

La adsorción del virus de la polio a células susceptibles, como son las células humanas o células originarias de simio, está determinada por la interacción de la cápside viral con receptores específicos que se encuentran en la superficie de la membrana (Bolognesi, 1974; Levintow, 1974; Lomberg-Holm, 1975). De esta forma la cápside proteica del virus juega un papel importante en el ciclo de multiplicación viral. Ha sido sugerido que el componente de menor peso molecular de la partícula viral, (VP4), es responsable de la adsorción de la partícula del virus (Briendl, 1971, b) y representa el sitio de reconocimiento antigénico (epítope), para la neutralización de anticuerpos (Briendl, 1971a. - Briendl, 1972). Aunque también se han encontrado sitios de unión en VP3 (Emini y cols., 1983). Cuando se provoca la pérdida de VP4 de la partícula viral, sobreviene consecuentemente la pérdida de infectividad (Briendl, 1971,b). De aquí se explica la importancia de la presencia de epítopes en VP4 como sitio antigénico para la unión de anticuerpos. Sin embargo la inducción de los mismos y el proceso de neutralización en virus es todavía pobremente entendido. Los anticuerpos generados por virus completos, no reaccionan con polipéptidos aislados de la cápside viral (Emini y cols., 1982; Icenogle y cols., 1981) lo que sugiere que los epítopes que ellos reconocen resulta, al menos en parte, del arreglo tridimensional de las proteínas en la cápside. Solo se ha encontrado res-

puesta antigénica con VP1 (Blondel cols., 1982; Chow y Baltimore, 1982; Van der Werf, 1983) y con VP4 (Briendl, 1971 a; Briendl, - 1972; Emini y cols., 1983) como polipéptidos aislados de la cápside.

Recientemente se ha propuesto que la neutralización viral puede ser mediada por anticuerpos que interactúan con VP1 a través de un mecanismo que provoca un cambio en la conformación del virion que puede inhibir el desencapsidamiento y subsecuentemente la expresión viral. Se sugiere una acción bivalente de anticuerpos para efectuar el cambio estructural (Emini y cols., 1983).

Al parecer casi todas las partículas virales tienen la capacidad de adsorberse a la membrana de las células. Sin embargo una vez adsorbidas, el futuro de la partícula viral puede variar. Más de la mitad de las partículas eluyen de la célula parcialmente dañadas, incapaces de adsorberse y de iniciar infeccion, pero conteniendo RNA en forma infectiva. Una pequeña fracción (alrededor del 10%) de las partículas adsorbidas inician la infeccion (Joklik y Darnell, 1961).

Se ha reportado que la interacción inicial célula-virus esto es, el fenómeno de adsorción, es independiente de temperatura (Davis y cols., 1980; Levintow, 1974). Por lo contrario el fenómeno de penetración es dependiente de la misma (Davis y cols., 1980).

No se sabe si la desencapsidación, esto es, la separacion de la cápside proteica del RNA, se lleva a cabo antes o después de la penetración, es decir, en la superficie celular o en la región intracelular, (Levintow, 1974), aunque parecen ser evenu

tos simultáneos (Luria y cols., 1978). Sin embargo, existe evidencia de penetración de proteína viral (Cantero, A., Tesis de Licenciatura, ENEP, Iztacala, UNAM, 1984).

Existen microfotografías que muestran una penetración directa del virus, al parecer intacto, en la membrana celular (Dunnebacke y cols., 1969). No obstante existen reportes donde se propone que durante el proceso de adsorción y penetración ocurre un cambio estructural en la cápside. Se han reportado partículas denominadas A, que contienen RNA genómico y carecen de VP4. La formación de estas partículas está relacionada con el fenómeno de adsorción y entrada del genoma viral a la célula ((Lonberg-Holm, 1975). Al parecer la conversión de partículas A, a otras partículas denominadas B, que tienen la misma estructura que las A, pero carecen de RNA, puede ser una medida de entrada de RNA a la célula. Se sugiere que la fuerte unión del virión a la membrana celular está asociada con un cambio estructural que libera la cápside viral, permitiendo la penetración del RNA a la membrana celular (Luria y cols., 1978).

a.4.2.) Alteración de las funciones del huésped.

Durante el proceso de infección sobreviene una alteración en las funciones de la célula huésped. Entre ellas la inhibición en la síntesis de proteínas y de la síntesis de RNA. Estas alteraciones por su importancia en el presente trabajo serán analizadas por separado más adelante.

a.4.3.) Síntesis de proteínas virus-específicas.

El lugar donde se lleva a cabo la síntesis de proteína es en los polirribosomas. Estos se forman de una cadena de RNA viral (+), que se asocia con un promedio de 35 ribosomas. Gran cantidad del RNA que se produce en las etapas tempranas de la infección, se incorpora a los polirribosomas (Levintow, 1974). Se ha reportado que una molécula recién sintetizada de RNA, se libera del complejo de replicación en forma simple y en pocos minutos se asocia al ribosoma. El proceso de ensamble del polirribosoma toma aproximadamente 10 minutos y el tiempo necesario para que una molécula de RNA sea traducida es aproximadamente de 5 minutos (Huang y Baltimore, 1970).

Estudios realizados (Chatterjee y cols., 1973) de comparación entre la iniciación de síntesis de proteína viral y la iniciación de síntesis de proteína celular, sugieren que no existe diferencia entre las mismas.

La síntesis de proteínas virales, esto es, la traducción del RNA viral, se inicia en un codón AUG, que se encuentra a 741 nucleótidos del extremo 5' y continúa por 6621 nucleótidos, hasta un codón UAG, que se localiza a 72 nucleótidos del tracto de Poli (A) del extremo 3' (Strauss y Strauss, 1983). Aunque existe evidencia de un sitio de iniciación interno en el RNA_m en las secuencias cercanas al extremo 3' (Dorner y cols., 1984).

Al analizar los polipéptidos virales en células infectadas, se observó que estos derivan de una molécula de gran tamaño,

que funciona como precursor de las mismas (Jacobson y Baltimore, 1970). Esta proteína ha sido denominada NCVPOO, la cual es procesada durante la traducción (Jacobson y Baltimore, op.cit., Kitamura y cols., 1981; Racaniello y cols., 1981). Este polipéptido representa el total del contenido de información traducible del genoma viral, dando lugar a todas las proteínas virales que se conocen, NCVPOO no se encuentra en condiciones naturales de infección y sólo se detecta cuando se bloquea el procesamiento, lo cual sugiere que esta proteína tiene una vida media muy corta (Jacobson y Baltimore, 1970). Esta formada de 2207 aminoácidos y está organizada en tres regiones (ver Fig. 2). En la región del grupo amino terminal, esto es, el extremo 5' del RNA (P1), se encuentran los genes para las proteínas de la cápside. La región central (P2) codifica para una proteasa y otros péptidos de bajo peso molecular de las que se desconoce su función. Por último, la región del grupo terminal carboxilo (región P3) incluye los genes para la replicasa viral, para una proteasa, para la proteína VPg (Strauss y Strauss, 1983) y para el posible precursor de ésta última (Baron y Baltimore, 1982; Semler y cols., 1982).

En el procesamiento de NCVPOO, ocurren al menos 10 divisiones (Rueckert y cols., 1979), casi todas realizadas por proteasas codificadas por el virus (Korant y cols., 1972).

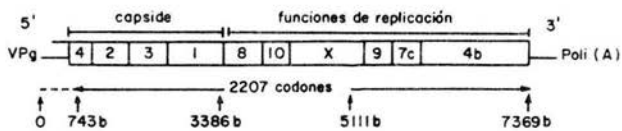
Las primeras dos divisiones, que separan la poliproteína en las tres regiones mencionadas (ver Fig. 2), ocurren muy rápido, mientras la proteína aún está sintetizándose (Korant, 1979; Lucas-Lenard, 1979).

Fig.2. Genoma de polio dividido en dos regiones. La primera dará lugar a proteínas de la cápside (P1) y la segunda a funciones de replicación (P2 y P3). P3 incluye los genes para la replicasa viral y VPg. Se señalan los pesos moleculares de las proteínas de la región P1:

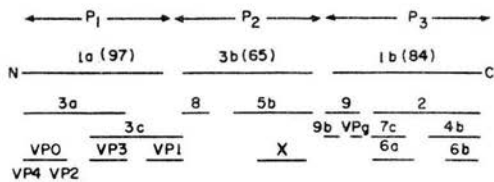
Región	Proteína	Peso Molecular (daltones)
P1	1a	97,000
	3a	64,000
	3c	60,000
	VP0	37,000
	VP3	26,000
	VP1	34,000
	VP4	7,000
	VP2	30,000

Tomado de: Rueckert, 3rd. Meeting of European Study Group. Urbino, Italia, Sept. 5-10, 1983

EL GENOMA DE POLIO



LAS PROTEINAS



El segmento precedente al codón de iniciación (740 nucleótidos) de la poliproteína, es tan extenso que podría codificar uno o más polipéptidos aún no identificados. Alternativamente el largo de esta región podría relacionarse al hecho de que el RNAm de polio, a diferencia de la mayoría de los RNAm celulares, carece de la estructura conocida como "cap" (residuo de guanina metilada en la posición 7) y la iniciación de la traducción debe reconocer otras características de RNA (Strauss y Strauss, 1983).

a.4.4.) Ensamblaje del virus y liberación del mismo.

Como se mencionó anteriormente, la síntesis de RNA viral comienza una hora después de iniciada la infección y continúa exponencialmente por 3 ó 4 horas llegando, posteriormente, a ser lineal (Rekosh, 1977).

A las dos horas de infección, el RNA sintetizado aún no forma parte de partículas virales siendo encapsidado, después de aproximadamente cuatro horas, el 20 % del RNA total sintetizado. Por estudios cinéticos (Baltimore y cols., 1966) se ha observado que una molécula de RNA puede ser cubierta con proteína viral en menos de cinco minutos después de su síntesis. Este proceso se lleva a cabo aún suprimiendo temporalmente síntesis de proteínas, lo cual sugiere la existencia de una poza de proteína estructural.

La formación del virus completo, involucra una serie de eventos, en los cuales las proteínas que darán origen a la cápside, son procesadas por ruptura o proteólisis y son agregadas para

constituir estructuras organizadas de tamaño creciente.

Los polipéptidos que darán origen a la cápside, provienen de un precursor único, NCVp1, en la región P1 (ver Fig. 2) -- (Jacobson y Baltimore, 1968). Este polipéptido se escinde para -- producir tres proteínas: VP0, VP1 y VP3. Estas tres proteínas en cantidades equimolares se ensamblan formando estructuras cada vez más complejas y se combinan con el RNA para constituir el virión_ final.

De tal forma que existe en la célula infectada una poza de precursores virales de proteínas formadora de la cápside. Toda esta proteína, para constituir una partícula de virus, puede ser sintetizada y procesada antes que su RNA (Baltimore y cols., 1966).

Se pueden distinguir, por estudios de sedimentación, -- tres formas físicas de cápsides en extractos de células infecta-- das con el virus de polio.

Primeramente se aisló una fracción viral (Phillips y -- cols., 1968) a partir de células HeLa infectadas con polio, la -- cual tiene un coeficiente de sedimentación de 10s, posteriormente corregido a 14s (Phillips y cols., 1969) que contenía polipépti-- dos virus-específicos, cercamente relacionadas con cápsides va--- cías que sedimentan a 73s. Esta fracción viral surge de la agrega-- ción de P1 (ver Fig. 2) para la formación de un pentámero (Mc Gre-- gor y cols., 1975).

Posteriormente se demostró in vitro, en extractos li--- bres celulares que la fracción 14s se ensambla para formar otra - fracción 73s (Phillips y cols., 1969; Perkin y Phillips, 1973). Se

pensó que este proceso podría estar mediado por enzimas y que se requiere de un factor proteico para el ensamblaje, que podía ser una proteína estructural (Drescher y cols., 1983; Putnak y Phillips, 1982). Se sugería que los componentes 14s y 73s eran precursores secuenciales del virión completo.

Cuando células HeLa infectadas con polio fueron suplementadas con guanidina, que inhibe la síntesis de RNA viral, se observó acumulación de un componente con un coeficiente de sedimentación de 80s (Jacobson y Baltimore, 1973) y que contenía una proteína que no se encontraba en viriones y carecía de dos proteínas del virión. A este componente se le denominó "procápside".

Las etapas subsiguientes de morfogénesis del virión involucra la unión de RNA y la procápside, y una proteólisis final en la cual VP0 se escinde a VP2 y VP4. (Blondel y Crainic, 1981; Phillips y cols., 1968; Putnak y Phillips, 1981). El virión maduro sedimenta a 150s (Luria y cols., 1978) ó 155s (Fernández-Tomás y Baltimore, 1973).

Una nueva estructura ribonucleoproteica específica del virus, fué aislada y parece ser un nuevo intermediario (provirión), precursor directo del virión (Fernández-Tomás y Baltimore, 1973). Esta estructura consiste de proteínas de procápside; VP0, VP1, VP3 y RNA viral. La proteólisis de VP0 para constituir VP2 y VP4, procede a la configuración del provirión y debe ser el evento final en la maduración del virión (Blondel y Crainic, 1981; Fernández-Tomás y cols., 1973; Jacobson y cols., 1970; Putnak y Phillips, 1981).

Con respecto a la liberación del virión, al parecer no hay mucha información.

Una vez que el ensamblaje del virión se ha llevado a cabo, sobreviene la ruptura de la membrana celular y los viriones ya completamente maduros, son liberados. Algún factor pro-teico viral probablemente se encuentre involucrado (Rekosh, 1977).

b.) Alteración de funciones del huésped durante infección viral.

b.1.) Inhibición en la síntesis de proteínas.

La inhibición de la síntesis de proteínas en las células infectadas por picornavirus es paralela a una desagregación progresiva de los polirribosomas (Del Angel, R.M., Tesis de Licenciatura, Universidad La Salle, 1984; Penman y cols., 1963). Se ha visto que durante la infección, la fracción de polirribosomas, parece estar alterada ligeramente con respecto al tamaño, constitución y capacidad funcional (Levintow, 1974).

Los ribosomas son capaces de formar polirribosomas específicos del virus y existe evidencia que sugiere la presencia de proteína viral asociada (Arévalo, S., Tesis de Maestría, CINVESTAV, IPN, 1983) lo cual puede permitir la distinción entre el RNA mensajero de la célula huésped y el viral.

La infección con el virus de la polio no modifica la estabilidad del RNA mensajero celular (Fernández-Muñoz y cols., 1976; Colby y cols., 1974); la estructura conocida como "cap" (el

residuo de guanina metilada en la posición 7, asociada al extremo 5' del RNAm del huésped) no es alterada, al igual que su grado de metilación y poliadenilación (Rose y cols., 1978).

Se ha visto también (Rose y cols., 1978) que la traducción del virus de estomatitis vesicular (VSV), un RNA estructuralmente relacionado al RNAm celular, es inhibida cuando células infectadas con VSV son coinfectadas con polio. La cinética de inhibición, tanto de la síntesis de proteínas de la célula huésped -- como de VSV, son idénticos, sugiriendo que ocurre por el mismo mecanismo. Tanto el RNAm de VSV como el de la célula poseen la estructura denominada "cap". Estas características son aparentemente importantes en el reconocimiento del ribosoma. En contraste, -- el RNAm del virus de polio posee una proteína (VPg) en unión covalente al extremo 5' (VPg) (Ambros y cols., 1978; Baron y Baltimore, 1982; Lee y cols., 1977; Rothberg y cols., 1978).

Se ha sugerido que esta diferencia pueda estar involucrada también en la "preferencia" de los ribosomas por traducir -- el RNA mensajero viral. Sin embargo este RNA puede iniciar traducción en presencia o ausencia de VPg (Golina y cols., 1980).

Por otro lado, se han reportado modificaciones en la -- formación del complejo proteico in vitro (Etchinson, 1983) junto con factores de iniciación (Hansen y cols., 1982), que reconocen a RNA mensajeros que poseen "cap". Este reconocimiento puede explicar la selectividad del ribosoma para reconocer al RNA mensajero.

Recientemente se ha planteado otra hipótesis (Contreras

y Carrasco, 1979). Se propone que la inhibición en la síntesis de proteínas puede ser influida por alteraciones en la membrana plasmática, lo que origina acumulación de iones monovalentes.

Experimentos realizados en el laboratorio con células HeLa infectadas con el virus de la polio, muestran que la cinética de inhibición en la síntesis de proteínas de la células huésped, coincide con la acumulación de sodio intracelular (Sánchez-Trujillo, Tesis de Licenciatura, ENEP, Iztacala, UNAM, 1983).

Estos experimentos apoyan la hipótesis de que modificaciones en la permeabilidad de la membrana celular contribuye, por un mecanismo aún no bien caracterizado, al efecto inhibitorio sobre la traducción del RNA del huésped.

Así, conjuntando la información disponible puede sugerirse un modelo que explique tanto la inhibición de la traducción del RNA del huésped, como el inicio de la síntesis de la proteína específica del virus, como dos eventos separados. En tanto que la infección produce una menor afinidad del RNAm celular por el ribosoma (modificación de factores de iniciación y de la concentración iónica intracelular), "modifica" también el ribosoma (asociación de proteína viral) de modo que ahora este puede reconocer a un RNAm diferente al del huésped.

b.2.) Inhibición en la síntesis de DNA.

La replicación de DNA, aunque tardíamente, también se -

Rekosh, 1977, Ensiminger y Tamm, 1970; Hand y Tamm, 1972).

b.3.) Inhibición de la síntesis de RNA.

Dado el objetivo del presente trabajo, se desarrolla con mayor amplitud el proceso de síntesis de RNA en células de manífero y los posibles mecanismos involucrados en la supresión de la transcripción, DNA-dependiente, durante infección con polio.

Se puede definir a la transcripción celular, como el proceso mediante el cual, a partir del DNA (templado), se va a sintetizar, RNA complementario.

El proceso de transcripción es selectivo, es decir, que existen unidades de transcripción bien definidas. Lo que significa que cada cadena de RNA se inicia en un sitio específico sobre el templado de DNA, y termina en otro sitio único. Existen señales específicas en el DNA que son reconocidas por el aparato de transcripción. A la región requerida para iniciar se le conoce como promotor, y las regiones requeridas para terminación se llaman regiones de terminador.

El proceso de transcripción DNA-dependiente va a estar mediado por moléculas de la enzima RNA polimerasa.

Se reconocen, en células eucarióticas tres diferentes enzimas. La RNA polimerasa I, cataliza la síntesis de RNA ribosomal, la RNA polimerasa II responsable de la síntesis de RNA heterogéneo nuclear (precursor del RNA mensajero) y la RNA polimerasa III es requerida en la síntesis de RNA de bajo peso molecular (de

transferencia 5s) (Chambon, 1975).

La enzima RNA polimerasa al catalizar la síntesis de RNA, requiere mecanismos de regulación que controlen el fragmento de DNA que debe ser transcrito, los sitios de la cromatina en que se inicia la síntesis y los sitios en que debe terminar de sintetizarse la cadena de RNA.

De los factores reguladores, son de importancia las proteínas no histónicas, cuyo papel regulador no sólo parece estar relacionado con los posibles cambios en la estructura de la cromatina (Weintraub y Groudina, 1976), sino que podrían determinar los segmentos del cromosoma que están disponibles para ser transcritos, esto es, en el control positivo y/o negativo de la función transcripcional de la cromatina.

Estas proteínas no histónicas como factores reguladores pueden interactuar, ya sea directamente con la RNA Polimerasa, (ejercer un control transcripcional a nivel de la enzima) o asociarse a la cromatina (Wang y Kostraba, 1978).

Así existen reportes en la literatura de una serie de proteínas no histónicas estimulantes de la transcripción que actúan sobre el DNA (Alfrey y cols., 1973; Kleinsmith, 1970; Natori y cols., 1973; Sekimizu y cols., 1976; Teng y cols., 1970). Algunas de estas proteínas se encuentran fosforiladas y estimulan la transcripción específica (Alfrey y cols., 1973; Shea y Kleinsmith, 1973; Sekimizu y cols., 1981). Se piensa que esta fosforilación de las proteínas no histónicas es esencial para su función (Alfrey y cols., 1973; Shea y Kleinsmith, 1973). Algunas otras proteínas -

Falta página

N° 25

ejercen un control negativo en la transcripción en sistemas virales, actuando también sobre el DNA (Handa y cols., 1983).

De aquí que se haya tomado como criterio general para proteínas involucradas en la transcripción específica, su afinidad a DNA, es decir, sus características selectivas de unión. Estas características de unión selectiva, puede reflejar el reconocimiento de secuencias específicas de DNA por estas proteínas en la iniciación de síntesis de RNA (Wang y Kostraba, 1978). Se ha demostrado la formación de complejos de preiniciación con factores proteicos y secuencias específicas de DNA (Davidson y cols., 1983; Tegtmeier y cols., 1981; Tjian R., 1978).

El mecanismo por medio del cual estos factores estimulantes incrementan la síntesis de RNA, puede ser estimado en términos de los eventos secuenciales generales reconocidos, como son la iniciación, la elongación y la terminación.

Con respecto a estos eventos secuenciales, iniciación y elongación de la cadena de RNA, se ha reportado la purificación de tres proteínas, denominadas SI, SII y SII', a partir de extractos totales de células tumorales ascíticas, que estimulan específicamente la actividad de la RNA polimerasa II in vitro (Natori y cols., 1973; Nakanishi y cols., 1981). Estos factores proteicos parecían ser buenos candidatos como proteínas reguladoras en transcripción, a nivel de iniciación, ya que se observó que incrementaban la formación de complejos de iniciación con la RNA polimerasa II y DNA en la presencia de nucleótidos trifosfatados (Sekimizu y cols., 1977).

Las proteínas SII y SII' fueron extensivamente caracterizadas y se encontró que SII' era una forma fosforilada de SII_ (Sekimizu y cols., 1981). Se sugirió que SII era esencial en la - transcripción eucariótica, ya que esta proteína se localizaba en_ el nucleoplasma y al aplicar anticuerpos contra SII, se inhibía - selectivamente la síntesis de RNA, dependiente de RNA polimerasa_ II (Ueno y cols., 1979).

Estudios de inmunofluorescencia indican que existen proteínas similares a SII distribuidas en el nucleoplasma de varios_ tipos de células eucarióticas (Sekimizu y cols., 1979). Además se reporta la evidencia de que proteína(s), que cruzan inmunológicamente con la proteína SII, participan en la síntesis de RNA a par_ tir de un sitio específico de iniciación en un lisado de células_ HeLa (Sekimizu y cols., 1982).

Existe otro trabajo reciente (Matsui y cols., 1980) en el que a partir del fraccionamiento de un extracto soluble preparado de citoplasma de células humanas, denominado KBS-100, se --- identificaron cuatro componentes que son requeridos para la ini-- ciación selectiva de la transcripción, mediada por RNA polimerasa II.

El papel real de estas proteínas en la transcripción es_ pecífica es desconocido, lo único que se sabe es que estas protef_ nas son indispensables para la iniciación específica de la trans- cripción.

Se ha mencionada que dentro de la alteración de funcio- nes que sufre la célula huésped cuando ha sido infectada con pi--

cornavirus, se encuentra la inhibición en la transcripción.

Reportes en la literatura indican que esta inhibición - ocurre a nivel de síntesis de RNA, ya que no se detecta degradación del DNA (Holland y Peterson, 1964), ni modificaciones en la estabilidad del RNA (Colby y cols., 1974; Fernández-Muñoz y Darnell, 1976).

El tamaño del reservorio de moléculas de RNA polimerasa, es idéntico en células infectadas y en células control (Aprilletti y Penhoet, 1978; Schawartz y cols., 1974). La actividad de RNA polimerasas solubles (I, II y III), probadas sobre DNA exógeno, se recupera a cualquier tiempo de la infección (Aprilletti y Penhoet, 1974, 1978; Schawartz y cols., 1974) y no existen alteraciones en las propiedades cromatográficas de las subunidades de la enzima aisladas de células infectadas (Aprilletti y Penhoet, 1978). Sin embargo, durante infección se detecta disminución en el número de moléculas de RNA polimerasa asociadas al templado, - esto es, activas en transcripción (Flores-Otero y cols., 1982).

Estas evidencias sugieren que la inhibición de la síntesis de RNA ocurre, dentro de los eventos secuenciales generalmente reconocidos para la transcripción, a nivel de iniciación.

Esta hipótesis fue corroborada en trabajos realizados con la reconstitución de un sistema de transcripción in vitro - (Crawford y cols., 1981), en los que se sugiere que los extractos de células infectadas carecen de, al menos, un factor proteico necesario en la iniciación específica de la transcripción.

Por otra parte, se ha manifestado que para que el fenó-

meno de inhibición se lleve a efecto, es necesaria la síntesis y acumulación de productos virales (Baltimore y cols., 1963; Fernández Tomás, 1982; Flores-Otero y cols., 1982; Penman y Summers, - 1965).

Se ha postulado también, la presencia de factores inhibidores, lípidos o lipoproteínas (Ho y Washington, 1971), al - - igual que proteínas virales (Balandin y Franklin, 1964), como - - agentes causales del mecanismo de inhibición. Además se ha encontrado la acumulación de proteínas virales en el núcleo de la célula huésped (Bienz y cols., 1982) cuando la transcripción se inhibe (Bossart y cols., 1984), lo que apoya esta hipótesis.

Trabajos en el laboratorio (Iturriaga, Tesis de maestría, CINVETAV, IPN, 1984) y de otros grupos (Bossart y cols., - 1982) utilizando sistemas de transcripción in vitro, han confirmado la presencia de inhibidores en extractos de células infectadas y la inhibición específica de la transcripción (Iturriaga, op.cit).

Se sugieren tres formas del posible mecanismo en el que el inhibidor viral puede actuar: 1) alterando algún o algunos factores esenciales para la iniciación específica de la transcripción, 2) papel activo del inhibidor sobre la RNA polimerasa, situación poco probable por la evidencia de la integridad de la enzima (Apriletti y Penhoet, 1974, 1978) y 3) asociándose al templado, por presentar alta afinidad hacia DNA, interactuando con el - promotor, sitio de iniciación de la síntesis de RNA, ya sea impidiendo el paso de la RNA polimerasa a través del templado, o bien bloqueando el sitio de unión del promotor con la enzima, de mane-

ra que en ninguno de los dos casos es posible el inicio de la - - transcripción.

c.) Presentación del trabajo.

Durante el proceso de infección con el virus de polio a células HeLa se desencadena una inhibición en la transcripción de la célula huésped. Existen evidencias de que esta inhibición ocurre a nivel de iniciación (Apriletti y Penhoet, 1974, 1978; Crawford y cols., 1982; Flores-Otero y cols., 1982) y se ha mostrado que extractos obtenidos de células infectadas son deficientes en al menos un factor requerido para la iniciación específica (Crawford y cols., 1982).

Por otra parte, se ha sugerido que para que esta alteración en la transcripción tenga efecto se requiere la síntesis y - acumulación de productos virales (Baltimore y cols., 1963; Fernández-Tomás, 1982; Penman y Summers, 1965). Al parecer algún factor proteico actúa como inhibidor (Balandin y Franklin, 1964; Bossart y cols., 1982, 1983, 1984).

Se ha tomado como criterio general, en cuanto a factores reguladores de la transcripción, su afinidad a DNA, que ya ha sido mencionada, al igual que para uno de los posibles mecanismos de actividad del supuesto inhibidor. Este factor inhibidor puede unirse selectivamente al promotor bloqueando el paso de la RNA polimerasa sobre el templado o bien la unión de ésta con el promotor, impidiendo la iniciación de la transcripción.

El objetivo del presente trabajo, fue estudiar posibles modificaciones en las proteínas asociadas a cromatina celular durante la infección viral, esperando relacionar estas modificaciones con el mecanismo de inhibición de la transcripción.

Uno de los puntos importantes del enfoque del trabajo - es el hecho de trabajar directamente con núcleos, a diferencia de otros estudios, ya que es ahí donde se lleva a cabo el proceso de transcripción y es ahí donde deben de encontrarse los factores reguladores o inhibidores de la misma.

Se realizaron extracciones de proteínas marcadas, utilizando diferentes concentraciones de sal, basándonos en las características selectivas de unión de los diferentes péptidos. Estas extracciones se hicieron a partir de núcleos aislados tanto de células infectadas como de células control, para analizar las proteínas que permanecieron unidas a cromatina y las que fueron extraídas.

Se encontró lo siguiente: a) un polipéptido inducido viral, asociado a cromatina celular. b) una proteína de origen celular, con baja afinidad por DNA, no detectada en células infectadas cuando la transcripción se encuentra abatida; la "disminución" de esta proteína, coincide con la cinética de inhibición de la transcripción.

M A T E R I A L E S

A) Células

Se utilizó la línea celular HeLa S-3 (derivados de un - carcinoma de cérvix uterino aislado de humano) creciendo en sus-- pensión. Esta línea celular se propaga constantemente en el labo ratorio, manteniéndose a una densidad de $3-6 \times 10^5$ células/milili tro.

B) Virus

Se empleó el virus de la Poliomiелitis tipo I, Mahoney, que es propagado en células HeLa, en el laboratorio. Este virus proviene del laboratorio de David Baltimore.

C) Medios de Cultivo

Medio Mínimo Esencial (MEM), modificado por Joklik (Gib co Laboratories) concentrado dos veces (2x). Para un litro de me dio, se disuelven dos sobres de medio liofilizado en 900 ml. de - agua bidestilada estéril. Se agregan 4 gramos de bicarbonato de sodio. El pH es ajustado a 7.4 con hidróxido de sodio 1 M. El - medio se esteriliza por filtración, utilizando membranas millipo- re HWAP (0.22u).

El medio liofilizado contiene:

Aminoácidos	Concentración (mg/lt)	Aminoácido	Concentración (mg/lt)
L-Arginina-HCl	105	L-Cistina-2HCl	34.4
L-Glutamina	294	L-Histidina	31
L-Isoleucina	52	L-Leucina	52
L-Lisina	58	L-Metionina	15

L-Fenilalanina	32	L-Treonina	38
L-Triptofano	10	L-Tirosina	47
L-Valina	46		

Carbohidratos Concentración
(mg/lt)

Glucosa 2000

Sales	Concentración (mg/lt)	Sales	Concentración (mg/lt)
-------	--------------------------	-------	--------------------------

NaCl	6500	KCl	400
------	------	-----	-----

MgCl ₂ ·6H ₂ O	200	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1327
--------------------------------------	-----	---	------

NaHCO ₃	3000		
--------------------	------	--	--

Vitaminas	Concentración (mg/lt)	Vitaminas	Concentración (mg/lt)
-----------	--------------------------	-----------	--------------------------

Colina	1	Acido Fólico	1
--------	---	--------------	---

Inositol	2	Nicotinamida	1
----------	---	--------------	---

D-Pentotenato de calcio	1	Piridoxal-HCl	1
----------------------------	---	---------------	---

Riboflavina	0.1	Tiamina-HCl	1
-------------	-----	-------------	---

Como indicador de pH se utiliza una solución de rojo de fenol (10 mg/lt) y como antibiótico, para prevenir contaminación, Penicilina potásica 7500 Unidades y Sulfato de estreptomina 50 Unidades.

- MEM (1x)

Para preparar un litro de medio se emplean 450 ml de medio concentrado (2x) estéril, 20 ml de solución de Penicilina-Estreptomina, 100 mls. de suero fetal de ternera (Laboratorios Biocel, México) y 10 mls. de mezcla de aminoácidos no esenciales (solución concentrada 100x)

D) Precursores radioactivos.

(5, 6 ³H) Uridina, Actividad específica 45Ci/mmol; - -
L (³⁵S) Metionina, Actividad específica 850-1440 Ci/mmol. Este -
material radioactivo se obtuvo de Amersham Radiometer Center - -
(Amersham, Inglaterra) y de New England Nuclear (Boston, Mass.)

E) Reactivos y Otros Materiales

- | | |
|--|---------------------------------------|
| - Acetato de Potasio | J.T. Baker (Méx. Co) |
| - Acido acético glacial | Merck (Méx.) |
| - Acido clorhídrico (HCl) | J.T. Baker (Méx. Co) |
| - Acido etilén diamino
tetracético (EDTA) | |
| - Acido N-2Hidroxietyl-piperazine
N'-2-etanesulfónico (Hepes) | J.T. Baker (Méx. Co) |
| - Acido tricloroacético | J.T. Baker (Méx. Co) |
| - Acrilamida | BDH (Inglaterra) |
| - Agarosa | Sigma Chemicals Co. (EUA) |
| - Albúmina sérica | Sigma Chemicals Co. (EUA) |
| - Aminoácidos | Sigma Chemicals Co. (EUA) |
| - Azul de coomassie | Sigma Chemicals Co. (EUA) |
| - Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃) | J.T. Baker (Méx. Co) |
| - Bis-Acrilamida | BDH (Inglaterra) |
| - Bis-Tris | Sigma Chemicals Co. (EUA) |
| - Carbonato de Sodio (Na ₂ CO ₃) | J.T. Baker (Méx. Co) |
| - Cloruro de Magnesio (MgCl ₂) | Merck (Méx.) |
| - Cloruro de Potasio (KCl) | Mallinckrodt Chemicals Works
(EUA) |
| - Cloruro de Sodio (NaCl) | J.T. Baker (Méx.Co) |
| - Detergente Desoxicolato de sodio | Merck (Méx.) |
| - Detergente Nonidet P-40 | BDH (Inglaterra) |
| - Ditiotreitól (DTT) | Sigma Chemicals Co. (EUA) |
| - Detergente Dodecil sulfato de
sodio (SDS) | BDH (Inglaterra) |
| - 2,5-Difeniloxazol (PPO) | Packard Co. (Suiza) |

- Etanol	J.T. Baker (Méx. Co)
- Floruro de fenil metil-sulfonilo (PMSF)	Bethese (EUA)
- Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4)	J.T. Baker (Méx. Co)
- Fuschina básica	M.C.B. (EUA)
- Glicerol	J.T. Baker (Méx. Co)
- Glicina	Merck (Méx.)
- Glutamina	Sigma Chemicals Co. (EUA)
- Hidróxido de sodio (NaOH)	J.T. Baker (Méx. Co)
- Marcadores de peso molecular	Sigma Chemicals Co. (EUA)
- Mercaptoetanol	Sigma Chemicals Co. (EUA)
- Metanol	J.T. Baker (Méx. Co)
- N,N,N',N' Tetrametilendiamina (Temed)	BRL (EUA)
- Penicilina G sódica	Farmaceuticos Lakeside (Méx.)
- Persulfato de amonio	Merck (Méx.)
- Reactivo de fenol (Folín)	Merck (Méx.)
- Rojo de fenol	Sigma Chemicals Co. (EUA)
- Sulfato cúprico (CuSO_4)	J.T. Baker (Méx. Co)
- Sulfato de estreptomina	Farmaceuticos Lakeside (Méx.)
- Tartrato de sodio y potasio	J.T. Baker (Méx.)
- Tolueno	Merck (Méx.)
- Tritón X-100	Sigma Chemicals Co. (EUA)
- Trizma-base	Sigma Chemicals Co. (EUA)
- Trizma-hidrocloruro	Sigma Chemicals Co. (EUA)
- Urea	BRL (EUA)
- Uridina	Sigma Chemicals Co. (EUA)
- Bolsa de diálisis "Spectrapore 3" Volumen de exclusión alrededor de 3500 de P.M.	Spectrum Medical Industries
- Papel Whatman 3MM-Whatman, Inglaterra	
- Película Kodak-Xomax XS-5, industrias Fotográficas Interamericana.	

F) Soluciones

- Solución amortiguadora para lavado de células. (PBS)

NaCl	137mM
KCl	3mM
Na ₂ HPO ₄	16mM
KH ₂ PO ₄	2mM

- Solución de Penicilina-Estreptomicina (100x)

Penicilina G Sódica	5x10 ⁶ U
Sulfato de Estreptomicina	5 gr
Aforar a 1 lt, H ₂ O bidestilada	
Filtrar mediante membrana millipore	

- Solución de Metionina (100x)

Metionina	1.5 gr
Ajustar pH 7.3	
Aforar H ₂ O bidestilada	
Esterilizar por filtración	

- Solución de glutamina (100x)

L-Glutamina	29.4 gr
Ajustar pH 7.3	
Aforar H ₂ O bidestilada	
Esterilizar por filtración	

- Solución amortiguadora hipotónica

Hepes, pH 7.9	10mM
KCl	10mM
MgCl ₂	1.5mM
DTT	3mM

- Solución amortiguadora hipertónica

Hepes, pH 7.9	0.3M
KCl	1.4M
MgCl ₂	0.03M

- Solución de PMSF
 - PMSF 50mM
 - Diluir en alcohol etílico absoluto

- Solución amortiguadora R'
 - Tris-HCl pH 7.9 50mM
 - NaCl 1000mM
 - DTT 0.2mM

- Solución amortiguadora de extracción (SAE)
 - Tritón X-100 0.05%
 - Tris-HCl, pH 7.9 10mM
 - DTT 1mM
 - PMSF 0.2mM

- Solución para tratamiento de tubo de diálisis
 - Na₂CO₃ 10%
 - EDTA 10mM

- Solución A (Lowry) para cuantificación de proteína
 - Na₂CO₃ 94mM
 - NaOH 50mM
 - Tartrato de sodio y potasio 47mM

- Solución B (Lowry)
 - CuSO₄ · 5H₂O 2mM

- Solución C (Lowry)
 - 50 partes sol. A
 - 1 parte sol. B
 - Esta solución debe ser preparada en el momento de su uso.

- Solución patrón de proteína (BSA) para Lowry

BSA	50 mg
Aforar H ₂ O bidestilada	50 ml

- Solución A para geles de acrilamida al 15%-SDS (EGA-SDS 15%)

HCL-1N	48 ml
Tris-base	36.3 gr
Temed	0.23 ml
Aforar H ₂ O bidestilada	100 ml

- Solución B para EGA-SDS (15%)

HCl	48 ml
Tris-base	5.98 gr
Temed	0.46 ml
Aforar H ₂ O bidestilada	

- Solución C para EGA-SDS (15%)

Acrilamida	44.2 gr
Bis-acrilamida	0.598 gr
Aforar H ₂ O bidestilada	
(Almacenar en la oscuridad)	

- Solución amortiguadora para corrida (EGA-SDS)

Tris-base	9 gr
Glicina	14.4 gr
SDS 10%	10 ml
Aforar H ₂ O bidestilada	3 lt

- Solución amortiguadora de muestra (EGA-SDS)

Tris-base, pH 6.8, 1M	10 ml
SDS 10%	20 ml
Mercaptoetanol	1 ml
Glicerol	60 ml
H ₂ O	9 ml

- Soluciones para geles bidimensionales (EGA-DD)

Acrilamida	4%
Bis-acrilamida	0.1%
Urea	8 M
Bis-Tris	0.057 M

Ajustar a PH 5.0 con ácido acético glacial

- Solución amortiguadora de corrida para la 1^a dimensión (pH 5)

Electrodo superior (+)
Bis-Tris pH 5.0 10 mM
Ajustado con ácido acético glacial

- Solución amortiguadora de corrida para la 1^a dimensión (pH 5)

Electrodo inferior (-)
Acetato de Potasio pH 5.0 0.79 M
Ajustado con ácido acético glacial

- Solución amortiguadora de muestra (1^a dimensión pH 5)

Urea	8 M
Mercaptoetanol	10%
Glicerol	10%
Acido acético	0.1%
Fuschina básica	0.01 mg

- Solución para equilibrar el gel cilíndrico (1^a dimensión pH 5)

Urea	4.0 M
Tris-HCl	0.5 M
SDS	1%

Ajustar a pH 6.8 HCl

- Solución D para segunda dimensión (EGA-SDS al 12%)

Acrilamida recristalizada	30%
Bis-acrilamida recristalizada	0.8%

- Las soluciones fueron esterilizadas por autoclave, 125°C durante 20 minutos, con 15 lb/cm² de presión y almacenadas a 4°C o - 20°C cuando fue necesario.

G) Composición de otros materiales

- Suero dializado

El suero fetal de ternera (Laboratorios Biocel) fue dializado en tubo "Spectrapore 3" contra 100 volúmenes de MEM de infección (sin suero, metionina, glutamina, penicilina ni estreptomicina) durante 18 horas.

- Mezcla de líquido de centelleo

Tolueno	1000 ml
Tritón X-100	600 ml
H ₂ O bidestilada	168 ml
PPO	3.5 gr

- Mezcla de aminoácidos no esenciales 100x para MEM

L-Alanina

L-Asparagina

L-Acido aspártico

L-Acido glutámico

L-Prolina

L-Serina

Glicina

Diluir en H₂O bidestilada y ajustar a pH 7.3

Esterilizar por filtración

M E T O D O S

a.) Cultivo y crecimiento de células Hela

Las células Hela en suspensión fueron cultivadas en matraces Erlenmeyer de 250 ó 500 ml, conteniendo 100 ó 250 ml respectivamente de MEM, suplementado con suero fetal de ternera, aminoácidos no esenciales y penicilina-estreptomicina. Los matraces permanecieron en agitación constante, en baño a 37°C. El cultivo se mantuvo a una densidad de 3 a 6×10^5 células por mililitro. El número de células se determinó mediante conteo en densitómetro.

b.) Infección con el virus de la Poliomiелitis (poliovirus)

La infección de células Hela con poliovirus se llevó a cabo por el método descrito (Baltimore y cols., 1966). Se cultivaron células creciendo en suspensión a una concentración de 3 a 6×10^5 cels./ml. Se centrifugaron a 1500 rpm, durante 3 minutos - (Centrifuga Internacional PR600) para obtener el paquete celular. Después de lavar con MEM de infección (sin suero, metionina, glutamina, penicilina ni estreptomicina), fueron resuspendidas en el mismo medio a una concentración de 10^7 cels./ml permitiendo la resuspensión mediante agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se adicionó el virus, haciendo el cálculo para una multiplicidad de infección (m_{di}) de 100 unidades formadores de placa (UFP) por célula y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se diluyó en el mismo medio precalentado, para tener una concentración de 5×10^6 cels./ml, continuando el periodo de absorción 15 minutos más, a la misma temperatura. Enseguida se centrifugó la suspensión (Centrifuga Interna-

cional, 1500 rpm) durante 3 minutos. El paquete celular se resuspendió en MEM de infección, suplementado con suero dialisado al 2% y con glutamina 1x a una concentración de 5×10^6 cels./ml. Inmediatamente se colocó la suspensión en agitación continua en baño a 37°C. Este punto corresponde al tiempo cero de la infección.

Para las células control se realizó exactamente el mismo procedimiento, excepto que no se adicionó el virus. Esta es la infección fingida.

c.) Síntesis de RNA durante infección viral

La velocidad aparente de síntesis de RNA se determinó por incorporación de uridina ^3H (4uCi/ml) mediante pulsos de 20 minutos a diferentes tiempos de la infección.

4×10^7 células fueron infectadas a una m.d.i de 100. Al tiempo cero de la infección, se tomaron 1×10^7 células (control e infectadas) y se marcaron con uridina (^3H) durante 20 minutos. Después de este tiempo se adicionó SDS 1%. Lo mismo se hizo a los tiempos 1, 2 y 3 horas postinfección. La muestra fue resuspendida hasta que la viscosidad desapareció. Se tomaron alícuotas de 200 μl s. y se pusieron en filtros de papel Whatman 3MM, para ser lavados con TCA al 10% durante 10 minutos y después 5 veces más con TCA al 5%. Finalmente se lavaron dos veces con alcohol etílico absoluto. Se secaron los filtros y se colocaron en viales conteniendo 5 ml de líquido de centelleo. La radioactividad se determinó en un espectrofotómetro Packard, modelo 3385.

d.) Cuantificación de proteína por el Método de Lowry
(Lowry, 1951).

Se tomaron muestras de 200 μ ls y se adicionó un ml de la solución C de Lowry a cada muestra y se mezcló perfectamente dejando reposar 10 minutos. Se agregaron 100 μ ls de reactivo de Fenol (Folín) diluido 1:1 y se mezcló vigorosamente. Se dejó a temperatura ambiente durante 45 minutos para después determinar la densidad óptica a 660 nm en un espectrofotómetro Carl Zeiss PMQ11.

Se realizó una curva patrón de proteína (BSA) en cada determinación, tomando distintas concentraciones de proteína para poder interpolar las densidades ópticas de las muestras.

e.) Marcaje e incorporación de Metionina ^{35}S a células HeLa.

Células HeLa en suspensión a una concentración de 5×10^7 cels./ml infectadas y no infectadas, fueron marcadas con Metionina ^{35}S , 20 $\mu\text{Ci/ml}$, durante un tiempo de 20 minutos ó 60 minutos, según las condiciones del experimento. Para detener la incorporación del aminoácido radioactivo se adicionó Metionina fría 100 veces en exceso y se colocó la suspensión en hielo, 5', para empastillar posteriormente las células mediante centrifugación y continuar con la extracción de núcleos.

f.) Aislamiento de núcleos

Después de un tiempo adecuado de infección según las -

condiciones del experimento, se tomó el cultivo de células y se centrifugó a 1500 rpm durante 3 min. para recolectar las células. Enseguida se procedió a la purificación de núcleos según el método reportado (Fernández-Tomás, 1982). Todos los pasos se realizaron a 4°C. El paquete celular fue lavado con PBS y con solución hipotónica después. Posteriormente las células fueron resuspendidas en dos volúmenes de solución hipotónica, colocadas en hielo durante 10 minutos y rotas mediante homogeneización (Dounce) con 7 golpes. Inmediatamente se agregó 0.1 vol. de la solución hipertónica, quedando un medio isotónico lo cual evita la lisis de los núcleos. La suspensión se estratificó sobre un colchón de glicerol 30% en solución R' (6 a 8 ml.) y se centrifugó a 3200 rpm durante 10 minutos (Centrifuga Internacional, PR600). Se recolectó un volumen equivalente al colocado (sobrenadante que corresponde a la fracción citoplasmática) y se guardó a -20°C. La pastilla nuclear se resuspendió en medio isotónico (10 vol. sol. hipotónica x 1 vol. sol. hipertónica) para una segunda purificación. La suspensión se agitó suavemente 5' y se suplementó con NP 40 gota a gota (concentración final de 0.15%) y se mantuvo en hielo durante 5 min. Se volvió a pasar la suspensión a través del colchón de glicerol. La pastilla resultante (núcleos purificados) fue resuspendida en solución amortiguadora de extracción y fue examinada en microscopio de contraste de fase para determinar que estuviera libre de material contaminante.

g.) Obtención del extracto nuclear.

Una vez obtenidos los núcleos purificados y resuspendi--

dos en solución amortiguadora de extracción (1 ml) se agregó cloruro de sodio, para ajustar a la concentración de sal adecuada, dependiendo de las condiciones del experimento. Se dejó reposando durante 30' en hielo y se centrifugó a 12,300 x g en un rotor SM24 de centrifuga Sorvall RC-2B, a 4°C durante 20 min. El sobrenadante conteniendo las proteínas solubilizadas a la concentración de sal utilizada, se removió cuidadosamente previniendo contaminación con la cromatina celular.

Para extraer y analizar las proteínas que permanecen asociadas a la cromatina después de la extracción con sal, se tomó el precipitado y se resuspendió en la misma solución amortiguadora, ajustándose a una concentración de 1 M NaCl. Posteriormente se sonicó 4 veces, 15 segundos a 10,000 micrones (sonicador - MSE).

Las fracciones proteicas (sobrenadante y precipitado) se dializaron contra 100 volúmenes de solución Tris, pH 7,5mM, durante 18 horas. A continuación las muestras se liofilizaron, (liofilizadora Virtis) para concentrarlas.

h.) Electroforesis de una sola dimensión en geles de acrilamida (EGA-SDS) (Gel en placa).

- Preparación de los geles EGA-SDS (al 15%) (Laemly, 1970)

Los geles de acrilamida-SDS se prepararon en dos placas de vidrio con separadores de 1-2 mm de espesor en una cámara de electroforesis en placa. Los geles se prepararon mezclando las siguientes cantidades de soluciones para geles de acrilamida:

Gel de resolución (15%)

Sol. C	10.64 ml
Sol. A	8.00 ml
H ₂ O bidestilada	12.72 ml

La solución se agitó vigorosamente y se añadieron 0.24 ml de SDS 10% y la misma cantidad de persulfato de amonio 10%, mezclándose otra vez. La mezcla se depositó entre las placas de vidrio en la cámara de electroforesis hasta una altura de 12 cm. Se añadió cuidadosamente SDS 1%, para aplanar la superficie. El gel concentrador (7.5%) se preparó de la siguiente manera:

Sol. C	1.57 ml
Sol. B	1.182ml
H ₂ O bidestilada	6.3 ml

Después de agitación hasta una solución homogénea, se adicionaron 90 uls de SDS 10% y 90 uls de persulfato de amonio al 10%. Esta mezcla se depositó sobre el gel de resolución. Se introdujo el separador, asegurándose de que no quedaran burbujas de aire. Se dejó polimerizar a temperatura ambiente.

- Preparación de las muestras de proteína

Las muestras de proteína radioactiva liofilizada, se re suspendieron en 100 ul de H₂O bidestilada estéril. Para determinar radioactividad, se tomaron muestras de 5 ul, que se pusieron en filtros de papel Whatman 3MM. Se lavaron una vez con TCA al

10% durante 10 minutos y 5 veces más con TCA al 5%. Por último - se lavaron con etanol absoluto dos veces. Se secaron y se colocaron en viales conteniendo 5 ml. de líquido de centelleo. Para determinar la radioactividad se utilizó un espectrofotómetro - - Packard, modelo 3385.

Se calculó una cantidad de muestra suficiente para tener de 2×10^4 a 5×10^4 cuentas por minuto (cpm) y se mezcló con el mismo volumen, de la solución amortiguadora de muestra para geles de acrilamida SDS, para tener un volumen de 100 ul. Las muestras así preparadas se calentaron durante dos minutos en baño María a punto de ebullición, antes de ponerlos sobre los pocillos del - - gel.

- Condiciones de corrida

Se colocó solución amortiguadora de corrida en los reservorios (superior e inferior). El gel se precorrió a 100 volts durante 1 hora. Seguidamente se depositaron las muestras en los sitios correspondientes del gel. La corrida se llevó a cabo durante 14 horas a 100 volts, hasta que el colorante salió del gel. El polo negativo se colocó en la parte superior y el positivo en el inferior.

- i) Electroforesis de doble dimensión en geles de acrilamida (EGA-DD) (Mets y Bogorad, 1974)
 - Primera dimensión (pH5)
 - Segunda dimensión (EGA-SDS)

- 1ª Dimensión (pH5)

Estos geles cilíndricos se prepararon en tubos de vidrio de 0.3 x 15 cm para obtener geles de 12 cm de largo. 5 ml de la solución, para preparar el gel de la primera dimensión, fueron polimerizados adicionando 5 ul de Temed y 15 ul de persulfato de amonio al 10%, el cual fue preparado inmediatamente antes de su uso. La solución fue agitada y degasificada al vacío durante dos minutos antes de ser colocada en los tubos de vidrio. Para estratificar el gel se añadió cuidadosamente H₂O bidestilada, dejando polimerizar a temperatura ambiente.

- Preparación de las muestras de proteína

Se tomó una cantidad de muestra liofilizada suficiente para tener de 2.5×10^5 a 4×10^5 cpm y se disolvieron en 100 ul de la solución amortiguadora para muestras del gel de primera dimensión. Las muestras permanecieron una hora a temperatura ambiente para después colocarlas sobre la superficie del gel.

- Condiciones de corrida

Se utilizó una cámara de electroforesis para geles cilíndricos. Los tubos que contenían a los geles se acomodaron dentro de la cámara. El reservorio superior se llenó con la solución amortiguadora de corrida para la primera dimensión (electrodo superior), y el de abajo con la solución correspondiente al electrodo inferior. Se eliminaron las burbujas y la muestra se colocó en la parte superior del gel. La electroforesis se llevó

a cabo a 120 volts durante 7 horas. El polo positivo se conectó a la parte superior y el negativo a la inferior.

- Equilibrio del gel cilíndrico para la segunda dimensión

Los geles cilíndricos se sacaron de los tubos mediante una jeringa de aguja larga conteniendo agua. Se introdujo la aguja en el tubo cuidando de no dañar el gel, y se inyectó agua bañando las paredes internas del tubo, provocando la salida del gel. Enseguida, el gel se colocó en la solución para equilibrar el gel cilíndrico dejando en agitación suave durante una hora.

2ª Dimensión (EGA-SDS) (gel en placa)

Los geles de acrilamida para la segunda dimensión (al 12%, con SDS) se prepararon de la siguiente manera:

En un matraz erlemeyer de 125 ml se mezclaron las siguientes soluciones para el gel de resolución:

Sol. D de acrilamida	12.00 ml
Tris pH 8.8 1M	11.25 ml
SDS 10%	0.30 ml
H ₂ O bidestilada	6.25 ml
Persulfato de Amonio 10%	120 ul

Se mezcló todo perfectamente y se colocó la solución entre dos placas de vidrio, dejando libre un cm en la parte superior. Se estratificó con SDS al 1% para aplanar la parte supe-

rior del gel, eliminando el SDS posteriormente, cuando el gel polimerizó. Para preparar el gel concentrador se mezcló lo siguiente:

Sol. D de acrilamida	1.33 ml
Tris pH 6.8 0.49 M	11.25 ml
SDS 10%	0.30 ml
H ₂ O bidestilada	7.20 ml
Temed	5 ul
Persulfato de Amonio 10%	100 ul

Después de equilibrado el gel cilíndrico de la primera dimensión, éste se colocó en la parte superior de la cámara, encima de las placas de vidrio y se selló con la solución del gel concentrador, eliminando las burbujas que pudieran interponerse entre el cilíndrico y el gel en placa. Se dejó polimerizar y se selló nuevamente con agarosa al 4%, formando un pocillo para los marcadores de peso molecular.

- Condiciones de corrida para la segunda dimensión

La solución amortiguadora de corrida para la segunda dimensión (acrilamida-SDS) se colocó en los reservorios superior e inferior. Se depositaron marcadores de peso molecular en el lugar correspondiente. El polo positivo se conectó en la parte inferior y el negativo en la superior. La corrida se llevó a cabo a 80 volts durante un tiempo de 12 a 14 horas.

j.) Tinción de geles

Para teñir las proteínas de los geles-SDS se utilizó - Azul de coomasie al 0.25% en metanol al 50% y ácido acético al 7%. Para desteñir los geles, se lavaron varias veces con metanol al 30%, ácido acético 7%, hasta que las bandas o las manchas de proteínas resaltaban sobre el fondo transparente del gel.

k.) Autorradiografía de geles.

Los geles se secaron al vacío con alta temperatura mediante un secador Modelo SE540 (Hoefer Scientific Instruments) exponiéndose posteriormente a películas Kodak X-omal (XS-5) en cartuchos para autorradiografía, a -70°C , durante un tiempo variable dependiendo del número de cpm colocados en el gel.

l.) Densitometría de los autorradiogramas

Los autorradiogramas se analizaron en un espectrofotómetro Gilford Modelo 240, con una longitud de onda de 550 nm y una densidad óptica de 0.5, a una velocidad de 2 cm/min.

m.) Procesamiento del tubo de diálisis

El tubo de diálisis se hirvió en una solución de Na_2CO_3 10% y EDTA 1 mM, durante 15 minutos. Posteriormente se lavó varias veces con agua bidestilada y se esterilizó por autoclave 20 minutos en EDTA 1 mM. Se conservó a 4°C , en solución de EDTA 1 mM suplementada con 2 ó 3 gotas de cloroformo.

n.) Obtención de pesos moleculares

Los pesos moleculares de proteínas se calcularon graficando el logaritmo en base 10 (\log_{10}) del peso molecular de marcadores de peso molecular conocido, contra la distancia migrada en el gel e interpolando posteriormente en la recta, los valores de las bandas de proteínas.

R E S U L T A D O S

a.) Síntesis de RNA en células HeLa infectadas con el virus de la Poliomiélitis.

Reportes en la literatura (Rekosh), 1977, han mostrado que la infección de células de mamífero con Picornavirus desencadena, entre otros efectos, inhibición en la síntesis de RNA de la célula huésped.

Durante la infección de células HeLa con el virus de la Polio, existe un rápido descenso en la velocidad de síntesis de RNA total (Darnell y cols., 1967; Flores-Otero y cols., 1982; Franklin y Baltimore, 1962).

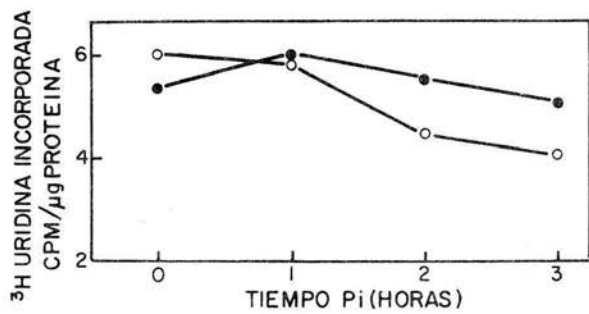
Con el fin de asegurarnos que la infección se llevó a cabo, se hizo un piloto de infección, esto es, se determinó la síntesis de RNA durante la infección. En la Figura 3 se muestra que en experimentos de cinética, es decir, midiendo velocidad de síntesis de RNA (incorporación de uridina ^3H a material ácido-insoluble) se detecta una disminución rápida en la velocidad de síntesis de RNA total en las células infectadas. Se puede observar a dos horas postinfección (p.i), un descenso en la síntesis de RNA, que se encuentra más marcado a las tres horas (50% de inhibición) como ha sido reportado (Flores-Otero y cols., 1982). Cabe señalar que en este experimento no se cuantificó el porcentaje de síntesis de RNA viral, que ha sido iniciado alrededor de los 140 minutos p.i. (Baltimore y cols., 1966; Flores-Otero y cols., 1982).

De tal forma que la inhibición de síntesis de RNA celular debe de ser más marcada si restamos en la gráfica, el porcen-

Fig.3. Síntesis de RNA en células HeLa infectadas con Polio.

Células HeLa en suspensión se infectaron a una multiplicidad de 100 y un cultivo paralelo se sometió a infección fingida (control). A diferentes tiempos se tomaron alícuotas del cultivo (1×10^7 células) y se suplementaron con Uridina-³H durante 20 minutos. A este tiempo se determinó la Uridina-³H incorporada a material ácido-insoluble - como se describe en Materiales y Métodos.

(○) Células infectadas; (●) Células bajo infección fingida.



taje de síntesis de RNA viral.

La velocidad de síntesis de RNA del grupo control, células bajo infección fingida, no sufre grandes variaciones (Figura 3).

b.) Proteína nuclear asociada a cromatina en células infectadas.-

Reportes en la literatura, han propuesto que la inhibición en la síntesis de RNA de la célula huésped, mediada por infección viral, ocurre a nivel de iniciación (Apriletti y Penhoet, 1974, 1978; Crawford y cols., 1981; Flores-Otero y cols., 1982).

Se ha sugerido que para que tal inhibición se lleve a cabo, se requiere la síntesis y acumulación de productos virales, dado que, utilizando guanidina (compuesto que no permite la transcripción viral) o puomicina (antibiótico que inhibe la síntesis de proteínas), se suprime la inhibición en la transcripción celular (Baltimore y cols., 1963; Penman y Summers, 1965). Factores proteicos han sido sugeridos como responsables del efecto inhibitorio (Balandin y Franklin, 1964; Bossart y cols., 1982; Fernández-Tomás, 1982; Ho y Washington, 1971; Iturriaga, Tesis de maestría, CINVESTAV, IPN, 1984).

Los datos reportados "in vivo", se han reproducido en experimentos realizados en sistemas de transcripción "in vitro", al ensayar la síntesis de RNA en núcleos suplementados con extracto citoplasmático proveniente de células infectadas, sugiriendo la presencia de un inhibidor citoplasmático (Balandin y Franklin,

1964, Bossart y cols., 1982). Otro sistema, utilizando promotores clonados, ha mostrado que estos extractos suprimen la iniciación específica (Iturriaga, op.cit.).

Uno de los mecanismos propuestos para explicar el fenómeno inhibitorio es la posible asociación de producto(s) virales al DNA, bloqueando el sitio de unión de factores proteicos requeridos para la iniciación, entre ellos a la propia RNA polimerasa impidiendo el tránsito de esta última. Siendo así, tal inhibidor tendría que tener afinidad a DNA.

Se puede considerar a las proteínas como afines y no afines a DNA, en base a compararlas con el patrón de afinidad de las proteínas histónicas en presencia de diferentes concentraciones de sal. La mayoría de las proteínas no histónicas son extraídas de la cromatina con 0.1 M NaCl, considerándose proteínas de baja afinidad por DNA (Gadsky y Chae, 1976; 1978). Las histonas permanecen asociadas a cromatina hasta 0.5 M NaCl, considerándose afines a DNA (Kleiman y Huang, 1972; Chae y cols., 1975).

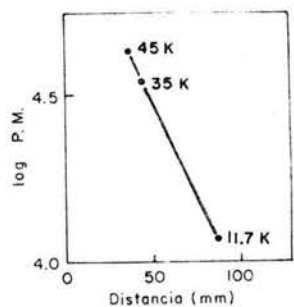
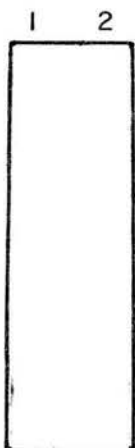
De aquí el interés en estudiar el patrón de proteínas asociadas a la cromatina celular en núcleos aislados de células infectadas. Se emplearon distintas concentraciones de sal para la extracción de las mismas haciendo un estudio comparativo con el patrón proteico obtenido de núcleos de células no infectadas.

Para ello se infectaron células HeLa S₃ con el virus de Polio como se ha descrito en Materiales y Métodos. Se permitió un tiempo de infección de 2 1/2 horas, tiempo en el cual la síntesis

Fig.4. Autorradiograma de las proteínas asociadas a cromatina - después de extracción de núcleos con 0.4 M NaCl. Cultivos de células HeLa (3×10^7 células) infectadas (2 1/2 horas p.i.) y no infectadas fueron suplementadas con Metionina ^{35}S durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo se procedió al aislamiento de núcleos (como se describe en - Materiales y Métodos). Los núcleos purificados fueron suplementados con cloruro de sodio, hasta una concentración final de 0.4 M y el DNA y las proteínas asociadas se separaron mediante centrifugación. Posteriormente se aislaron los péptidos y se analizaron en geles de acrilamida - SDS al 15% y autorradiografía. En el recuadro se muestra la migración de los marcadores de peso molecular utilizados en este trabajo.

Carril 1. Proteínas asociadas a la cromatina aislada de -
células infectadas.

Carril 2. Proteínas asociadas a la cromatina obtenida ba-
jo infección fingida.



sis de RNA del huésped se encuentra inhibida en más de un 50%. Posteriormente los cultivos, control e infectado, se suplementaron con Metionina ^{35}S ; a los 60 minutos se prepararon extractos nucleares (ver Materiales y Métodos) y éstos se analizaron en gels de acrilamida-SDS sometiendo, después del secado de los mismos a autorradiografía.

En la Figura 4 se muestran los resultados. Como puede observarse se detecta una proteína en el grupo infectado de aproximadamente 35,000 daltones de peso molecular (p.m). (Figura 4-1) que permanece asociada a la cromatina, después de la extracción con 0.4 M NaCl. Resultados preliminares mostraron que esta proteína no se solubiliza hasta una concentración de 0.7 M NaCl (dato no mostrado), es decir a concentraciones altas de sal, por lo que podemos decir que presenta alta afinidad por DNA. Así se denominará proteína con afinidad por DNA (PAD). Esta proteína no es detectada en el grupo control (Figura 4-2).

Estos resultados nos sugieren que la PAD de 35,000 daltones (PAD-35) es una proteína de origen viral. Sin embargo, no se puede descartar que se trate de una proteína de origen celular que sufra alguna modificación provocada por la infección; tal modificación podría cambiar su afinidad por DNA, permitiendo su asociación a cromatina durante la infección.

c.) Proteína solubilizada en 0.4 M NaCl en núcleos aislados de células control.

Con la finalidad de descartar que PAD-35 fuera una proteína celular modificada, se analizaron las proteínas solubilizadas de la cromatina de células no infectadas, a las diferentes concentraciones de sal empleadas en el experimento anterior.

En la figura 5 se observa la autorradiografía de las proteínas solubilizadas. Como puede observarse (Figura 5-1) se detecta una proteína de 35,000 daltones de p.m., proteína de baja afinidad por DNA, de origen celular, dado que no se detecta en el sobrenadante obtenido de núcleos aislados de células infectadas (Figura 5-2).

Este resultado apoyó la idea de la posible modificación de una proteína del huésped, de modo que adquiriera afinidad por DNA. Sin embargo, no es un criterio definitivo considerar dos proteínas similares, por el sólo hecho de tener el mismo patrón de migración en un gel de una sola dimensión, es decir, por tener parecido peso molecular.

d.) Análisis de proteínas nucleares en electroforesis de doble dimensión.

El análisis en electroforesis por dos dimensiones permite una mejor caracterización de proteínas, ya que se separan por dos criterios diferentes. En este trabajo se analizaron las muestras de proteínas en electroforesis de doble dimensión: la primera por gradiente de pH (migración por acidez relativa de las proteínas) y la segunda, en acrilamida -SDS (migración por peso molecular) (Tsurugi y cols., 1977).

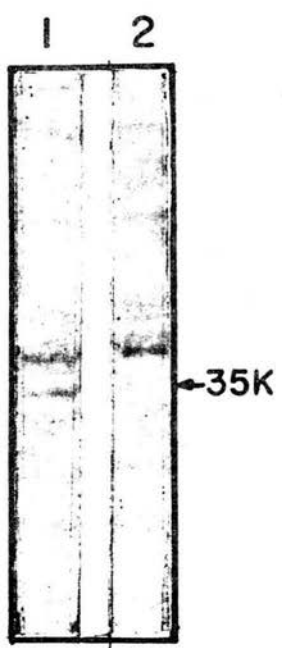
Falta página

N° 65

Fig.5. Autorradiograma de las proteínas solubilizadas de la cromatina con 0.4 M cloruro de sodio. El método seguido en la infección y la purificación de núcleos es el mismo indicado en la Figura 4, a excepción de que en este ensayo se analizaron las proteínas solubilizadas, esto es, el sobrenadante obtenido después de la centrifugación. El análisis se llevó a cabo también en geles de acrilamida-15% y autorradiografía.

Carril 1. Proteínas solubilizadas obtenidas en núcleos de células control.

Carril 2. Proteínas solubilizadas obtenidas en núcleos de células infectadas.



En base a los resultados anteriores, se sugirió la posible modificación de una proteína del huésped. Tal modificación debería involucrar un cambio de afinidad de esta proteína a DNA de modo que se asocie a la cromatina durante la infección viral. Existe la posibilidad de que tal modificación se lleve a cabo en el núcleo. Se analizaron las proteínas nucleares solubilizadas y asociadas a cromatina en una concentración de 0.4 M NaCl.

Los resultados se muestran en la Figura 6. Como se puede observar en el extracto soluble proveniente de células bajo infección fingida, se localizan prioritariamente dos proteínas - - (38,000 y 35,000 daltones, Figura 6-A). En el extracto soluble proveniente de células infectadas se detecta únicamente la proteína de mayor peso molecular (Figura 6-B) no detectando a la proteína de 35,000 daltones.

El ensayo, por el mismo criterio, de las proteínas que permanecen asociadas a la cromatina de células infectadas muestra en la Figura 7, que PAD-35 es menos básica que el polipéptido de 35,000 daltones solubilizado en extractos nucleares de células bajo infección fingida (ver Figura 6-A).

De ocurrir una modificación en la proteína de origen celular hacia mayor afinidad por DNA, se esperaría que dicho péptido mostrara una conducta electroforética hacia la región más básica.

e.) Localización de PAD-35 en el citoplasma.

En base a los resultados anteriores, se sugirió la posible modificación de una proteína del huésped. Tal modificación debería involucrar un cambio de afinidad de esta proteína a DNA de modo que se asocie a la cromatina durante la infección viral. Existe la posibilidad de que tal modificación se lleve a cabo en el núcleo. Se analizaron las proteínas nucleares solubilizadas y asociadas a cromatina en una concentración de 0.4 M NaCl.

Los resultados se muestran en la Figura 6. Como se puede observar en el extracto soluble proveniente de células bajo infección fingida, se localizan prioritariamente dos proteínas (38,000 y 35,000 daltones, Figura 6-A). En el extracto soluble proveniente de células infectadas se detecta únicamente la proteína de mayor peso molecular (Figura 6-B) no detectando a la proteína de 35,000 daltones.

El ensayo, por el mismo criterio, de las proteínas que permanecen asociadas a la cromatina de células infectadas muestra en la Figura 7, que PAD-35 es menos básica que el polipéptido de 35,000 daltones solubilizado en extractos nucleares de células bajo infección fingida (ver Figura 6-A).

De ocurrir una modificación en la proteína de origen celular hacia mayor afinidad por DNA, se esperaría que dicho péptido mostrara una conducta electroforética hacia la región más básica.

e.) Localización de PAD-35 en el citoplasma.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Fig.6. Análisis en geles bidimensionales, de las proteínas solubilizadas con 0.4 M cloruro de sodio.

Las proteínas en núcleos solubilizadas con 0.4 M cloruro de sodio, se analizaron en geles bidimensionales de - - pH 5-acrilamida-SDS.

Cuadro A: proteínas solubilizadas presentes en núcleos de células control.

Cuadro B: proteínas solubilizadas presentes en núcleos de células infectadas.

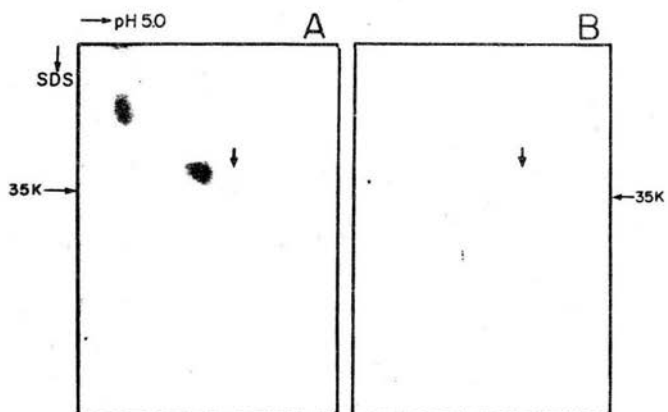
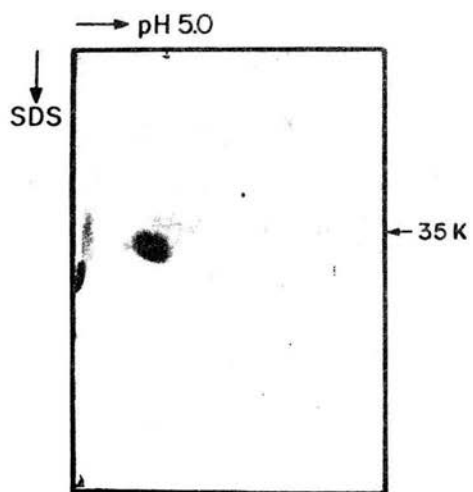


Fig.7. Autorradiograma del análisis bidimensional de proteínas asociadas a la cromatina de células infectadas después de extracción con 0.4 M cloruro de sodio. Núcleos purificados de células HeLa infectadas y suplementadas con Metionina ^{35}S se resuspendieron en 0.4 M cloruro de sodio durante 30 minutos a 0-4°C. Transcurrido este tiempo se aisló la cromatina mediante centrifugación (ver Materiales y Métodos) y la proteína asociada al DNA se analizó en geles bidimensionales (como se describe en la Figura 6) y posterior autorradiografía.



Estos datos sugieren que PAD-35 no es una proteína celular modificada en el núcleo. Aunque debe descartarse también, - que esté presente en el citoplasma y que se modifique en este compartimiento celular.

Con esta finalidad, extractos citoplasmáticos provenientes de células infectadas y control, se analizaron en electroforesis de doble dimensión.

La figura 8 muestra el patrón proteico en citoplasma de células control (8-A) y de células infectadas (8-B). Como puede observarse, PAD-35 aparece en el citoplasma de células infectadas y no es detectada en el control.

Con estos datos, inferimos que PAD-35 es una proteína - inducida viral. Esta conclusión se basa en: a) se marca radioactivamente, es decir, se sintetiza durante infección, b) sólo se - encuentra en citoplasmas de células infectadas y al parecer acumulada, c) es más ácida que una proteína similar (por peso molecular) de origen celular (Pc35).

Es de llamar la atención la ausencia de Pc35 en núcleos de células infectadas.

f.) Pc35 y su posible relación con la transcripción.

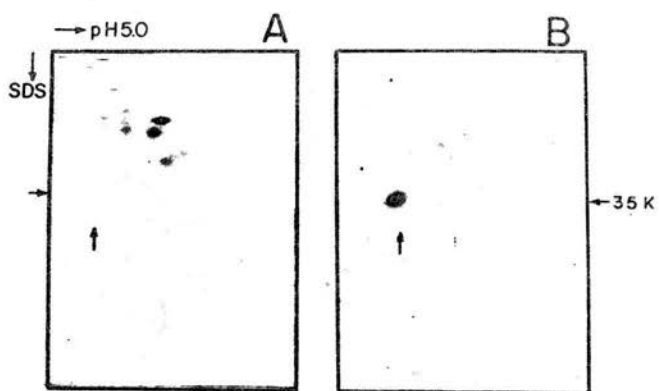
Un hallazgo interesante es la ausencia en células infectadas de la proteína Pc35. Crawford y cols., (1981) han reportado que extractos de células infectadas son deficientes en al menos un factor proteico, requerido para la iniciación específica -

Fig.8. Autorradiograma del análisis bidimensional de proteínas - de localización citoplasmática.

Los extractos citoplasmáticos obtenidos en el experimento descrito en la Figura 4, fueron analizados en geles bidimensionales pH 5-acrilamida-SDS (ver Materiales y Métodos).

Cuadro A: proteínas presentes en el extracto citoplasmático obtenido de células control.

Cuadro B: proteínas presentes en el extracto citoplasmático obtenido de células infectadas.



de la transcripción. Pc35 puede ser un candidato para dicho factor.

Dado que Pc35 es una proteína con baja afinidad por DNA (soluble desde 0.2 M NaCl) (ver figura 5-1) y no se detecta durante infección (ver Figura 5-2), se realizaron experimentos de cinética con el fin de correlacionar la ausencia de Pc35 y la supresión de la transcripción. Se infectaron células HeLa como se ha descrito en Materiales y Métodos y a diferentes tiempos (especificados en la Figura 9), se adicionó Metionina ^{35}S . Posteriormente se aislaron núcleos y se analizó la proteína solubilizada en 0.4 M NaCl.

Como puede verse en la Figura 9 (carriles 1, 3 y 5) se distinguen las dos proteínas mayoritarias ya mencionadas (Pc38 y Pc35) en el extracto control, en tanto que en extractos provenientes de células infectadas, (carriles 2, 4 y 6) Pc35 no se detecta a partir de las dos horas p.i.

La cinética descrita, muestra que Pc35 desaparece gradualmente siguiendo una secuencia paralela a la inhibición en la transcripción celular (Figura 10). Los resultados de este análisis densitométrico muestran que la relación entre Pc38 y Pc35 aumenta, a expensas de una disminución de la segunda, a las dos horas después de iniciada la infección (Figuras 10-C y 10-D). En la tabla I se observa la cuantificación en cuanto al porcentaje de disminución de Pc35 (35%) con respecto al control.

En la figura 11 se observan relacionadas la disminución

de Pc35 y la supresión de la síntesis de RNA "in vivo". Estos resultados muestran la relación paralela entre la disminución gradual de Pc35 y la inhibición en la síntesis de RNA detectada durante infección viral.

Fig.9. Presencia de Pc35 a diferentes tiempos de infección viral. Alícuotas de células HeLa (3.2×10^8 células) infectadas y no infectadas fueron suplementadas con Metionina ^{35}S durante 20 minutos, a diferentes tiempos de la infección. La suspensión conteniendo los núcleos purificados se ajustaron a 0.4 M cloruro de sodio. Las proteínas solubilizadas se analizaron en geles de acrilamida-SDS y posterior autorradiografía (ver Materiales y Métodos).

Carriles 1, 3 y 5: proteínas solubilizadas de núcleos de células control.

Carriles 2, 4 y 6: proteínas solubilizadas de núcleos de células infectadas.

0, 1 y 2 horas p.i. respectivamente.

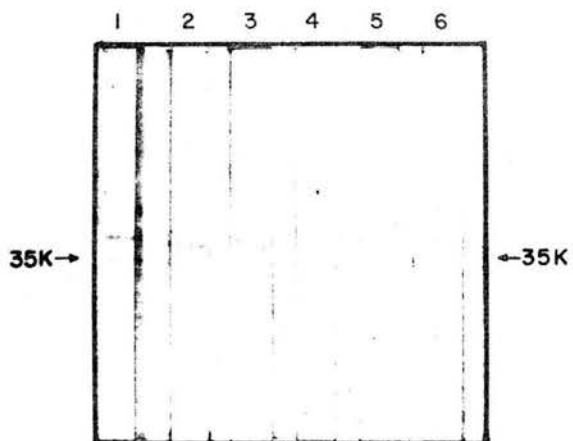


Fig.10. Ensayo densitométrico de las proteínas solubilizadas en núcleos. Los autorradiogramas descritos en la Figura 9 fueron analizados por densitometría a 550 nm (ver Materiales y Métodos).

Cuadro A: densitograma de autorradiografía de proteínas solubilizadas en núcleos de células control.

Cuadro B: densitograma de autorradiografía de proteínas solubilizadas en núcleos de células infectadas (0 hrs. p.i.).

Cuadro C: densitograma de autorradiografía de proteínas solubilizadas en núcleos de células control.

Cuadro D: densitograma de autorradiografía de proteínas solubilizadas en núcleos de células infectadas (2 hrs. p.i.).

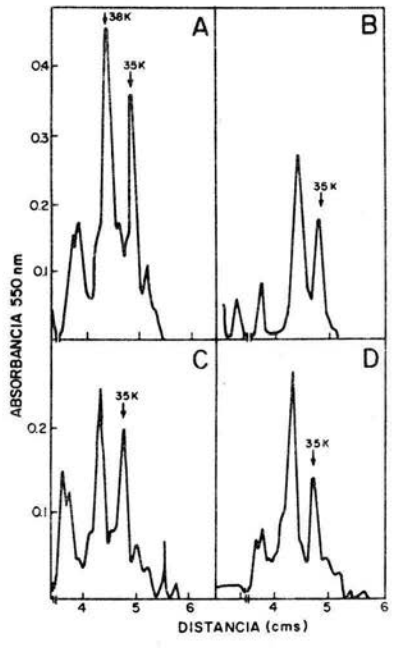


Fig.11. Correlación entre disminución de Pc35 y supresión de síntesis de RNA en células infectadas. Se cuantificó la - concentración relativa de la proteína Pc35 mediante el - densitograma descrito en la Figura 10 y que se detalla - en la Tabla I. Este porcentaje se relacionó con el por ciento de inhibición de síntesis de RNA en células infectadas reportado (Flores-Otero y cols., 1982).

(●) Células HeLa control (tomado como 100%)

(○) Células HeLa infectadas

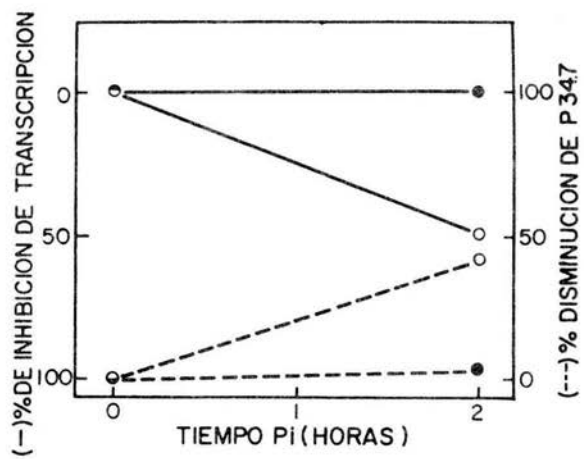


TABLA I

Tiempo p.i. (Hrs.)	Rel. 35/38	
	Control	Infectado
0	0.73 (100%)	0.67 (100%)
2	0.81 (101%)	0.44 (65%)

Porcentaje de disminución de Pc35 en relación a Pc38 a 0 y 2 horas postinfección.

* La relación del tiempo "cero" es considerada como 100%, tanto en el grupo control como en el infectado (Ver texto para más información).

D I S C U S S I O N

Se mencionó anteriormente, que el virus de la Poliomi-
litis presenta ventajas en cuanto a su manejo en el laboratorio -
para ser utilizado como un medio de conocimiento de los procesos
moleculares de expresión genética, que se llevan a cabo en las cé-
lulas bajo infección viral.

El motivo principal de este trabajo fue el tratar de -
profundizar más sobre los conocimientos que hasta el presente se
tienen acerca del mecanismo de inhibición en la transcripción, me-
diada por infección con el virus de la Polio.

Por otra parte, la estrategia de trabajar directamente
con núcleos, presenta ventajas en cuanto que: a) ya sea que se -
trate de falta de actividad de factores reguladores a nivel de -
iniciación de la transcripción (Crawford y cols., 1981), o bien -
b) de factores proteicos inducidos virales, como responsables del
fenómeno de inhibición de la transcripción mediada por infección
con picornavirus (Balandin y Franklin, 1964; Bossart y cols., - -
1982; Flores-Otero y cols., 1982; Fernández-Tomás, 1982; Iturria-
ga, Tesis de maestría, CINVESTAV, IPN, 1984) estos factores pro-
teicos deben realizar su actividad (reguladora o inhibidora) en -
el núcleo celular y es ahí donde deben estar presentes, resultan-
do complicado localizarlos en el citoplasma.

La táctica de utilizar concentraciones de sal como méto-
do de extracción de proteínas nucleares, asume que los factores -
proteicos, de origen celular o inducidos virales, deben ser afi-
nes a DNA, esto es, deben tener características selectivas de - -

unión. Podemos distinguir entre proteínas de baja afinidad hacia DNA, aquéllas que no se encuentran asociadas a cromatina a bajas concentraciones de sal (0.1 a 0.2 M sal) (Gadski y Chae, 1976; - 1978) y proteínas afines o de alta afinidad por DNA, las que permanecen unidas a cromatina a altas concentraciones de sal (0.2 a 1 M sal), según el patrón de afinidad de las histonas (Chae, cols. 1975; Kleiman y Huang, 1972).

Después de 3 1/2 horas de iniciada la infección de células HeLa por el virus de poliomielitis, se encuentra una proteína inducida viral asociada a la cromatina, en presencia de altas concentraciones de sal (Figura 4, carril 1), de modo que es un péptido viral con alta afinidad por DNA (PAD 35).

La asociación de este péptido a la cromatina celular posiblemente esté relacionada con el fenómeno de inhibición en la síntesis de RNA. Por otra parte, una proteína celular de parecido peso molecular pero relativamente más básica, de baja afinidad por DNA, disminuye del extracto celular gradualmente, conforme la inhibición en la transcripción va en aumento (Figura 9 y 11).

Presumiblemente PAD35 es un péptido viral, aunque no podemos descartar completamente que una proteína celular sufra una modificación, no conocida, por lo que su punto isoeléctrico sufre una gran variación, encontrándose más ácida asociada a la cromatina. Sin embargo, esta posibilidad es poco probable. Aún así decimos que PAD es un péptido inducido viral.

A lo que se refiere el término "inducido", es a las al-

teraciones de proteínas que se producen a causa de la infección viral, ya sean transformaciones en los péptidos de origen celular o bien proteínas provenientes del genoma viral, sin descartar ninguna de las dos posibilidades.

El hecho de que PAD35, proteína inducida viral, se encuentre asociada a cromatina a 3 1/2 horas postinfección, tiempo en el que la síntesis de RNA se encuentra abatida, sugiere que esta proteína esté involucrada en el mecanismo de inhibición de la transcripción.

Existen dos formas en las que un factor proteico inducido viral podría actuar inhibiendo la transcripción interactuando con la cromatina: a) el factor proteico puede unirse al DNA en el sitio de iniciación, es decir, en el promotor, después de que la RNA polimerasa se ha anclado en este lugar, impidiendo así el paso de esta última por el templado, de modo que la transcripción no se inicia, y b) que este factor proteico se una al DNA en el promotor, precisamente en el sitio específico de interacción de éste con factores de iniciación o con la misma polimerasa, bloqueando así, el sitio de asociación de estos factores al promotor, provocando que tampoco se inicie la transcripción.

Estas hipótesis concuerdan con lo que ha sido propuesto por Flores-Otero (1982), con respecto a que la inhibición en la síntesis de RNA de la célula huésped durante la infección, ocurre por un bloqueo a nivel de iniciación, idea que es apoyada por otros sistemas virales (Apriletti y Penhoet, 1978; Schwartz - -

y cols., 1974; Weck and Wagner, 1979).

Se propone a PAD35, proteína inducida viral, de alta afinidad por DNA, que aparece asociada a cromatina de células HeLa después de 3 1/2 horas p.i., como posible inhibidor de la transcripción.

La asociación de este péptido (PAD35) a la cromatina celular, cuando la transcripción se encuentra inhibida, coincide con la hipótesis de que una proteína viral se encuentra involucrada en el mecanismo de inhibición, como ha sido sugerido (Baltimore y cols., 1963; Balandin y Franklin, 1964; Bossart y cols., 1982; Fernández-Tomás, 1982; Flores-Otero y cols., 1982; Iturriaga, Tesis de Maestría, CINVESTAV, IPN, 1984; Penman y Summers, 1965).

Se ha demostrado la acumulación de proteínas virales en el núcleo de la célula huésped (Bienz y cols., 1982) lo que también apoya nuestros resultados.

La localización de PAD35 en el citoplasma de las células infectadas corresponde con la suposición de Balandin y Franklin (1964), de que en células infectadas, una proteína viral sintetizada en el citoplasma, migra hacia el núcleo e interactúa con las funciones nucleares del huésped.

Los trabajos anteriores únicamente sugieren la presencia de un inhibidor, como agente causal de la inhibición en la síntesis de RNA (Balandin y Franklin, 1964; Bossart y cols., 1982)

a nivel de iniciación (Iturriaga, op. cit.), pero no dan evidencia del sitio de acción de tal inhibidor. El presente trabajo, basándose en los anteriores y con los resultados presentados, sugiere la actividad del posible inhibidor (PAD35), sobre el DNA, en el promotor, ya que la inhibición ocurre a nivel de iniciación.

Estos resultados no se contradicen con lo reportado por Crawford y cols., (1982), con respecto a que las células infectadas son deficientes en al menos un factor proteico involucrado en iniciación específica, ya que se reporta también, en este trabajo la "disminución" gradual del Pc35 concomitante con la inhibición en la transcripción (Figura 9 y 11), lo que sugiere a este péptido, como posible factor de iniciación y como blanco de la infección.

En conclusión, se propone que se encuentran latentes las dos posibilidades, tales que pueden ocurrir paralelamente: a) la presencia de un inhibidor inducido viral (PAD35), y b) la existencia de un factor blanco de la infección (Pc35), como agentes causales de la inhibición específica de la transcripción.

Es necesario caracterizar más este sistema y hacer otros experimentos que demuestren el papel directo de estos péptidos dentro de los mecanismos de patogenia viral.

R E F E R E N C I A S

- Abraham G., Rhodes, D. P., and Banerjee, A. K., (1975). The 5'-terminal structure of the methylated mRNA synthesized in vitro - by vesicular stomatitis virus. *Cell*, 5, 51.
- Agrawal, H. O., (1966). Studies on the structure of poliovirus-*Arch. Ges. Virusforsch.* 19, 365.
- Allfrey, V. G., Inove, A., Karn, J., Johnson, E. M., and Vidali, G., (1973). Phosphorylation of DNA-binding nuclear acidic -- proteins and gene activation in the HeLa cell cycle. *Cold. Spring Harbor. Symp. Quant. Biol.*, 38, 785.
- Alonso, A., and Carrasco, L., (1981). Selective inhibition of cellular protein synthesis by anphotericin B in EMC virus infected-cells. *Virology*, 114, 247.
- Ambros, V., Patterson, R.F. y Baltimore, D., (1978). An enzymatic activity in infected cells that cleaves the linkage between-- poliovirus RNA and the 5' terminal protein. *Cell*, 12, 1439.
- Apriletti, j. W., and Penhoet, E. E., (1974). Recovery of DNA-dependent RNA polymerase activities from L-cells after mengovirus--infection. *Virology*, 61, 597.
- Apriletti, J. W., and Penhoet, E. E., (1978). Cellular RNA synthesis in normal and mengovirus -infected L-929 cells. *J. Biol. Chem* 253, 603.
- Balandin, I. G., and Franklin, R.M., (1964). The effect of mengo virus infection on the activity of the DNA-dependent RNA polymerase of L-cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 15, 27.
- Baltimore, D., (1964). In vitro synthesis of viral RNA by the poliovirus RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 51, 450.

-Baltimore, D., (1969). In *Biochemistry of viruses* (H. B. Levy, ed.) Marcel Decker, N. Y., 101;

-Baltimore, D., Franklin, R. M., and Callender, J., (1963). Mengo virus induced inhibition of host ribonucleic acid and protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 76, 425.

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

-Baron, M.H. and Baltimore, D., (1982). Anty-VPg antibody inhibition of the poliovirus replicase reaction and production of covalent complex of VPg-related proteins and RNA. *Cell*, 30, 755.

-Baron, M. and Baltimore, D., (1982). Antibodies against the chemically synthesized genome-linked protein of poliovirus react with native virus-specific proteins. *Cell*, 28, 395.

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

-Bienz, K., Egger, D., Rasser, Y. and Bossart, W., (1982). Accumulation of poliovirus proteins in the host cell nucleus. *Intervirology*, 18, 305.

-Bienz, K., Egger, D., Rasser Y. and Bossart, W., (1983). Intracellular distribution of poliovirus proteins and the induction of virus-specific cytoplasmic structures. *Virology*, 131, 39.

-Blondel, B., and Crainic, R., (1981). Relations entre la structure et les propriétés antigéniques des picornaviruses. *Bull. Inst. Pasteur*, 79, 79.

-Blondel, B., Crainic, R. and Horodniceau, F., (1982). Le polypeptide structural VP1 du poliovirus type 1 induit des anticorps neutralisants. C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., (Paris) III, 294, 91.

-Bolognesi, A.P., (1974). Structural components of RNA tumor viruses, in *Advances in Virus Research*, (Lauffer, M.A., Bang, F.B.,--Maramorch, R., Smith, K.M., eds.) Academic Press, N.Y., 19, 315.--

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

-Bossaer, W., Eggere, D., Rasser, Y. and Bienz, K., (1984). Accumulation of poliovirus proteins in uninfected isolated HEp-2 cell nuclei in vitro. Intervirology, 21, 150.

-Both, G.W., Banejee, A.K. and Shatkin, A.J., (1975). System for chromatin reconstitution. Proc. Natl. Acad. Sci., 72, 1189.

-Briendl, M., and Koch, G., (1972). Competence of suspended HeLa cells for infection by inactivated poliovirus particles and by isolated viral RNA. Virology., 48, 136.

-Briendl, M., (1971a). VP4, the D-reactive part of poliovirus. Virology, 46, 962.

-Briendl, M., (1971b). The structure of heated poliovirus particles. J. Gen. Viro., 147, 156.

-Brown, D., Hansen, J., and Ehrenfeld, E., (1980). Specificity of initiation factor preparations from poliovirus infected cells. J. Virol., 34, 573.

-Caliguirri, L.A., and Tamm, I., (1970). The role of cytoplasmic--

membranes in poliovirus biosynthesis. *Virology*, 42, 100.

-Colby, D.S., Finnerty, V. and Lucas-Lennard, J., (1974). Fate of mRNA of L-cells infected with mengovirus. *J. Virol.*, 13, 858.

-Contreras, A. and Carrasco, L., (1979). Selective inhibition of protein synthesis in virus-infected mammalian cells. *J. Virol.*, 29 114.

-Clough, W.D., Kunkel, M.L., Davidson, L.R., (1982). 5-azacytidine induced reactivation of Herpes simplex thymidine kinase gene. --- *Science*, 216, 70.

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

-Chae, C.B., Galski, R.A., Carter, D.B. and Efird, P.H., (1975). - Chromatin reconstitution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 67, 1459

-Chambon, P., (1975). Eukaryotic nuclear RNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.*, 44, 613.

-Chatterjee, N.K., Koch, G. and Weissback, H., (1973). Initiator of protein synthesis in vivo in poliovirus infected HeLa cells. - *Arch. Biochem. Biophys.*, 154, 431.

-Chiu, J.F., Wang, S., Fujitani, H. and Hnilica, L.S., (1975). RNA DNA-binding chromosomal non-histone proteins. Isolation, characterization and tissue specificity. *Biochemistry*, 14, 4552.

-Chow, M. and Baltimore, D., (1982). Isolated poliovirus capsid protein VP1 induces a neutralizing response in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79, 7518.

-Darnell, J.A., Girard, M., Baltimore, D., Summers, D.F. and Mai
zel, J.V., (1967). In the Molecular Biology of viruses (Colter, --
J.S. and Paranchych, W., eds.), Academic, N.Y., 375.

-Dasgupta, A., (1983 a). Antibody to host factor precipitates po-
liovirus RNA polymerase from poliovirus infected HeLa cells. Viro
logy, 182, 252.

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

-Davidson, J.N., (1976). The biochemistry of the nucleic acids, -
8th ed., Academic Press, N.Y.

-Davis, B.P., Dulbecco, R., Eisen, H.E. and Ginsberg, H.S. (1980)-
Picornaviruses, in Microbiology, 3a, ed. (Harbor y Row eds.) Ha---
gerstown, Mryland, 1096.

-Davidson, B.L., Egli, J., Mulvihill, R., Chambon, P., (1983). --
Formation of stable preinitiation complexes between eukaryotic --
class B transcription factors and promoter sequences. Nature, 301,
5902.

-Dorner, A., Semler, B., Jackson, R., Hanecak, R., Duprey, E. and
Wimmer, E., (1984). In vitro traslation of poliovirus RNA: utili-
zation of internal initiation sites in reticulocyte lysate. J. of
Virol., 50, 507.

-Drescher-Lincoln, K., Putnak, R., Phillips, A., (1983). Use of--
temperature-sensitive mutants to study the morphogenesis of polio
virus. Virology, 126, 301.

-Dunnebacke, T.H., Levinthal, J.D. and Williams, R.C., (1969). En
try and release of poliovirus as observed by electron microscopy-
of cultured cells. J. Virol., 4, 505.

-Emini, E.A., Dorner, A.J., Dorner, L.F., Jameson, B.A. and Wimmer, E., (1983). Identification of a poliovirus neutralization epitope through use of neutralizing antiserum raised against a purified viral structural protein. *Virology*, 124, 144.

-Emini, E.A., Jameson, B.A., Lewia, A.J., Larsen, G.R. and Wimmer, E., (1982). Poliovirus neutralization epitopes : analysis and localization with neutralizing monoclonal antibodies. *J. Virol.*, 43, 997.

-Emini, A.E., Ostapchuck, P. and Wimmer, E., (1983). Bivalent attachment of antibody onto poliovirus leads to conformational alteration and neutralization. *J. of Virology*, 48, 547.

-Ensminger, W.D. and Tamm, F., (1970). The step in cellular DNA synthesis blocked by Newcastle disease or mengovirus infection. *Virology*, 40, 152.

-Etchinson, D. and Ehrenfeld, E., (1981). Comparison of replication complexes synthesizing poliovirus RNA. *Virology*, 111, 33.

-Etchinson, D., Milburn, C., Edery, I., Sonenberg, N. and Hershey B., (1983). Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000 dalton polypeptide associated with eukaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. *The J. Biol. Chem.*, 257, 14806

-Fernández-Muños and Darnell, J.E., (1976). Structural difference between the 5' termini of viral and cellular mRNA in poliovirus-infected cells: possible basis for the inhibition of host protein-synthesis. *J. Virol.*, 18, 719.

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

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

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

-Flores-Otero, Fernández-Tomás y Gariglio Vidal, (1982). DNA and RNA polymerases during poliovirus infection: reduction in the number of form II enzyme molecules. Virology, 116, 619.

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

-Gadski, R.A., and Chae, C.B., (1976). Mode of reconstitution of chicken erythrocyte and reticulocyte chromatin. Biochemistry, 15, 3812.

-Gadski, R.A., and Chi-Bom, Ch., (1978). Mode of chromatin reconstitution, in The cell nucleus, (H. Busch, ed.), Academic Press, N. Y., 4, 267.

-Girard, M., Baltimore, D. and Darnell, J.E., (1967). The poliovirus replication complex: site for synthesis of poliovirus RNA. J. Mol. Biol., 24, 59.

-Golini, F., Semler, B., Dorner, a. and Wimmer, E., (1980). Protein linked RNA of poliovirus incompetent to form an initiation complex of translation in vitro. Nature. 287, 600.

-Graunboulan, N. and Girard, M., (1969). Molecular weight of poliovirus ribonucleic acid. J. Virol., 4, 475.

-Handa, H., Kingston, R., and Sharp, P., (1983). Inhibition of adenovirus early region IV. Transcription in vitro by a purified viral DNA binding protein. *Nature*, 302, 545.

-Hand, R., Ensminger, W.P., and Tamm, I., (1971). Cellular DNA replication in infections with cytocidal RNA viruses. *Virology*, 44, -527.

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

-Hansen, J., Etchinson, D., Hershey, J., and Ehrenfeld, E., (1982) Association of cap-binding protein with eukariotic initiation factor 3 in initiation factor preparations from uninfected and poliovirus infected HeLa cells. *J. of Virol.*, 42, 200.

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

-Hofer, E., Hofer-Warbinek, R. and Darnell, E.J., (1982). Glogin RNA transcription: a possible termination site and demonstration of transcriptional control correlated with altered chromatin structure. *Cell*, 29, 887.

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

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

-Icenogle, J., Gilbert, S.F., Grieves, J., Anderegg, J., and Rue-

ckert, R., (1981). Monoclonal antibodies to poliovirus. *Virology*, 115, 211.

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

-Jacobson, M.F. and Baltimore, D., (1968). Polypeptide cleavages in the formation of poliovirus proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci., -USA*, 61, 77.

-Jahner, D., Stuhlmann, H., Stewart, L.C., Harbers, K., Lohler, J., Simon, I., and Jaenisch, R., (1982). De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. *Nature*, 298, 623.

-Kitamura, N., Semler, B.L., Rothberg, A.G., Larsen, G.R., Adler, C.J., Dorner, A.J., Emini, E.A., Hanecack, E., Lee, J.J., Van der Werf, S., Anderson, C.W. and Wimmer, E., (1981). Primary structure gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. - *Nature*, 291, 547.

Kleiman, L.J., and Huang, R.C., (1972). Cell-free synthesis and processing of the proteins of viruses. *J. Mol. Biol.*, 64, 1.

-Kleinsmith, L.J., Stein, J.R., and Stein, G.S., (1976). Dephosphorylation of non histone proteins specifically alters the patterns of gene transcription in reconstituted chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73, 1174.

-Korant, B.D., (1979). Role of cellular and viral processes in the processing of picornavirus proteins. In: *The molecular Biology of the picornaviruses*, Plenum Press, N.Y. 149.

-Korant, B., Chow, N., Lively, M., Powers J., (1979). *Virus-speci*

fic protease in poliovirus-infected HeLa cells. Proc. Natl. Acad. Sci., 76, 2992.

-Laemly, U.K., (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Natur, 227, 685.

-Lee, Y.F., Kitamura, N., Detjin, B.M., and Wimmer, E., (1977). A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 59.

-Lehninger, L.A., (1979). Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. Cap. 31, 32, Omega, Barcelona, 867-936.

-Levintow, L., (1974). The reproduction of picornaviruses, in Comprehensive virology, 2 (Conrat, F. and Wagner eds.) Plenum Press-N.Y.

-Lewin, B., (1974). Gene expression 2, Wiley, London, 180-222.

-Lonberg-Holm, K., (1975). The effects of concanavalin A, on the early events of infection by Rhinoviruses type 2 and poliovirus - type 2. J. Gen. Viro., 28, 313.

-Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Fair, A.L. and Randall, R.J., (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265.

-Lucas-Lenard, J.M., (1979). Virus-directed protein synthesis. In The molecular biology of picornaviruses, (Perez-Becoff, R., ed.), Plenum, N.Y. 127.

-Luri-, S.E., Darnell, J.E., Baltimore, D. and Campbell, A., (1978) Animal viruses: adsorption and entry into the cell, in General Virology, Wiley, N.Y., 306.

- Mc Gregor, S., Hall, L. and Rueckert, R.R., (1975). Evidence for the existence of protomers in the assembly of encephalomyocarditis virus. *J. Virol.*, 15, 1107.
- Maizel, J.V. and Summers, D.F., (1968). Evidence for differences in size and composition of the poliovirus specific polipeptides - in infected HeLa cells. *Virology*, 36, 48.
- Mandel, B., (1967). The relationship between penetration and uncoating of poliovirus in HeLa cells. *Virology*, 31, 702.
- Matsui, T., Segall, J., Weil, P.A. and Roeder, R.G., (1980). Multiple factors required for accurate initiation of transcription - by purified RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.*, 255, 11992.
- Mets, L. and Bogorad, L., (1974). Two dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis: an improved method for ribosomal proteins.-- *Annal. Biochem.*, 57, 200.
- Nakanishi, Y., Sekimizu, K., Tamura, H. and Natori, S., (1981). Purification of a new protein stimulating RNA polymerase II from Ehrlich Ascites tumor cells: comparison with proteins purified before. *J. Biochem.*, 90, 805.
- Natori, S., Takeuchi, K., Takahashi, K. and Mizuno, D., (1973).-- DNA dependent RNA polymerase from Ehrlich Ascites tumor cells. *J. Biochem.*, 73, 879.
- Nomoto, A., Lee, Y.F. and Wimmer, E., (1976). The 5' end of poliovirus mRNA is not capped with m⁷G(5')ppp(5')Np. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73, 375.
- Oyama, V. and Eagle, H., (1956).. Measurement of cell growth in-- Tissue culture with a phenol reagent (Folin-ciocalteau). *Pros.Soc. Exptl. Bio. and Med.*, 91, 305.

- Penman, S., Becker, Y., and Darnell, J.E., (1964). A cytoplasmic structure involved in the synthesis and assembly of poliovirus components. *J. Mol. Biol.*, 8, 54.
- Penman, S., Scherrer, K., Becker, Y., and Darnell, J.E., (1963). Polyribosomes in normal and poliovirus infected HeLa cell and their relationship to messenger RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 49, 654.
- Penman, S., and Summers, D., (1965). Effects on host cell metabolism following synchronous infection with poliovirus. *Virology* 27, 614.
- Perkin, M., and Phillips, B.A., (1973). In vitro assembly of poliovirus III. Assembly of 14s particles into empty capsids by poliovirus-infected HeLa cell membranes. *Virology*, 53, 107.
- Phillips, B.A., (1969). In vitro assembly of poliovirus. I. Kinetics of the assembly of empty capsids and the role of extracts from infected cells. *Virology*, 39, 811.
- Phillips, B.A., Summers, D.F. and Maizel, J.V., (1968). In vitro assembly of poliovirus related particles. *Virology*, 35, 2116.
- Putnack, R., and Phillips, B.A., (1981). Picornaviral structure and assembly. *Microbiol. Rev.*, 45, 287.
- Putnack, R., and Phillips, B.A., (1982). Poliovirus empty capsid morphogenesis. I. Evidence for conformational differences between self and extract-assembled empty capsids. *J. of Virol.*, 41, 792.
- Racaniello, J.R., and Baltimore, D., (1981). Molecular cloning of poliovirus sequence of the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78, 4887.

- Rekosh, K., (1977). The Molecular Biology of Picornavirus, in -- the Molecular Biology of Animal Viruses, 1, (P. Nayak, ed.) Marcel Dekker, N.Y.
- Roeder, R.G.? and Rutter, W.J., (1970). Specific nucleolar and - nucleoplasmic RNA polymerases. Proc. Natl. Acad. Sci., 65, 675.
- Rose, J.K., and Lodish, H.F., (1976). Translation in vitro of vesicular stomatitis virus mRNA lacking 5'-terminal 7-methylguanosine. Nature, 262, 32.
- Rose, J.K., Trashesel, H., Leong, K., and Baltimore, D., (1978).-- Inhibition of translation by poliovirus inactivation of a specific initiation factor. Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 2732.
- Rothberg, P.G., Harris, T.J., Nomoto, A., and Wimmer, E., (1978). "O" (5'-uridyl)-tyrosine is the bond between the genome-linked -- protein and the RNA of poliovirus. Proc. Natl. Acad. Sci., 75,--- 4868.
- Rueckert, R.R., (1971). Picornaviral architecture, in Comparative Virology, (Maramorosh, K., and Kurstak, E., eds.), Academic, N.Y., 255.
- Rueckert, R.R., (1976). Picornaviruses, in Comprehensive Virology, (Fraenkel-Conrat and Wagner eds.), Plenum Publishing Corp., N.Y.- 6, 131.
- Rueckert, R.R., Matthews, R.J., Kew, O.M., Pallansch, M., Mc Lean C., Omillianowski, O., (1979). Synthesis and processing of picornaviral polyprotein. In: The Molecular Biology of Picornaviruses, (Pérez-Bercoff, R., ed.), Plenum, N.Y., 113.
- Rueckert, R.R., and Wimmer, E., (1984). Systematic nomenclature of

picornavirus proteins. *J. of Virol.*, 50, 957.

-Sekimizu, K., Kobayashi, N., Mizuno, D., and Natori, S., (1976). Purification of a factor from Ehrlich Ascites Tumor cells specifically stimulating RNA polymerase II. *Biochemistry*, 15, 5064.

-Sekimizu, K., Kubo, Y., Segawa, K., and Natori, S., (1981). Difference in phosphorylation of two factors stimulating RNA polymerase II of Ehrlich Ascites Tumor cells. *Biochemistry*, 20, 2286.

-Sekimizu, K., Mizuno, D., and Natori, S., (1977). Enhancement of the initiation complex by a factor stimulating RNA polymerase II from Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem. Biophys. Acta*, 479, 180

-Sekimizu, K., Mizuno, D., and Natori, S., (1979). Localization of a factor stimulating RNA polymerase II in the nucleoplasm, revealed by immunofluorescence. *Exp. Cell Res.*, 124, 63.

-Sekimizu, K., Mizuno, D., and Natori, S., (1982). Evidence that stimulatory factor(s) of RNA polymerase II participates in accurate transcription in a HeLa cell lysate. *J. Biol. Chem.*, 257-6, 2719.

-Semler, B., Anderson, C., Hanecack, R., Dorner, L., and Wimmer, E., (1982). A membrane-associated precursor to poliovirus VPg identified by immunoprecipitation with antibodies directed against a synthetic heptapeptide. *Cell*, 28, 405.

-Semler, B., Hanecak, R., Dorner, F., Anderson, C., and Wimmer, E., (1983). Poliovirus RNA synthesis in vitro: structural elements and antibody inhibition. *Virology*, 126, 624.

-Shaffer, F., and Schwerdt, E. (1959). Purification and properties of poliovirus. *Advanc. Virus Res.*, 6. 159.

- Shea, M., and Kleinsmith, L., (1973). Template-specific stimulation of RNA synthesis by phosphorylated non-histone chromatin -- proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 50, 473.
- Shenk, T., (1981). Transcriptional control regions: nucleotide-sequence requirements for initiation by RNA polymerase II and -- III. *Current Topics Microbiol. Immunol.*, 3, 25.
- Shwartz, L. B., Lawrence, C., Thach, R.E. and Roeder, R.G., (1974). Encephalomyocarditis virus infection of mouse plasmacytoma-cells. *Virology*, 14, 611.
- Spector, D.H., and Baltimore, D., (1974). Requirement of 3'-terminal poly(adenylic acid) for the infectivity of poliovirus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71, 2983.
- Spector, D., and Baltimore, D., (1975). Polyadenylic acid on poliovirus RNA II. Poly (A) on intracellular RNAs. *J. of Virol.*, 15 1413.
- Satrauss, G., and Strauss, H., (1983). Replication strategies - of the single stranded RNA viruses of eukariotes, in *Current Topics in Microbiol. and Immunol.*, 105.
- Tegtmeyer, P., Andersen, B., Shaw, S., Wilson, G., (1981). Alternative interactions of the SV40 A protein with DNA, *Virology*, 115, 75.
- Teng, C.T., Teng, C.S., and Allfrey, V.G., (1970). Species-specific interactions between nuclear phosphoproteins and DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 41, 690.
- Tjian, E., (1978). The binding site on SV40 DNA for a T-antigen related protein. *Cell*, 13, 165.