

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 23 del Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN, bajo la dirección de los Doctores Carlos Fernández-Tomás y José Tapia Ramírez, con el patrocinio del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.



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.

A MIS PADRES
CONSUELO Y ROSALIO

A MAMA ROSITA

A GRIS, ROSITA Y FERNANDO

A MIS HERMANOS
ANDREA, JULIA, JUAN, JOAQUIN
DANIEL Y OCTAVIO.

A HECTOR Y HOMERO

A CRISTINA, PILAR, ROSARIO Y MANUEL.

A MARGARITA, ADRIANA, JOEL Y CESAR .

A ALEJANDRO, MIGUEL, GILBERTO
Y ARMANDO.

A BETO .

A JOSE .

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS QUE
SABEN QUE AUN CUANDO SU NOMBRE
NO APAREZCA, ESTAN PRESENTES.

I N D I C E

i	Resumen
ii	Abreviaturas
1	Introducción
7	Inhibición de la Traducción
12	Inhibición de la Transcripción
29	Estudios con el Minicromosoma SV40
30	Racional
32	Origen de los Materiales
34	Preparación de Soluciones, Medios de Cultivo y Amortiguadores
38	Metodología
38	Mantenimiento de Línea Celular CV-1
39	Purificación de Viriones SV40
40	Titulación de SV40 (UFP)
41	Infección con SV40 y Coinfección con Poliovirus
42	Extracción de Minicromosomas
44	Concentración de Minicromosomas
46	Análisis de Restricción
47	Resultados
47	Purificación y Titulación de Viriones de SV40
49	Extracción de DNA, su Análisis en Gradiente de Sacarosa y Ensayo de Restricción
60	Discusión
65	Conclusiones
66	Bibliografía

RESUMEN

Durante la infección con poliovirus ocurren cambios importantes en el metabolismo de la célula huésped que incluyen una inhibición de la transcripción celular. Nosotros hemos venido empleando al minicromosoma del virus SV40 (bajo coinfección con polio) como un sistema análogo de cromatina celular para estudiar el problema. En el presente trabajo analizamos la estructura del minicromosoma de SV40 (M-SV40) inhibido durante la coinfección con polio (M-SV40-POLIO) en células CV-1, utilizando como criterio la migración en gradientes de sacarosa y la accesibilidad al corte con enzimas de restricción.

Los minicromosomas se obtuvieron mediante dos métodos diferentes de extracción, isotónico e hipotónico.

Los resultados obtenidos muestran que no hay diferencias en el patrón de sedimentación en sacarosa para M-SV40 y M-SV40-POLIO. En lo que respecta al patrón de restricción no se encontró una diferencia significativa para ambos minicromosomas con todas las enzimas empleadas, lo cual sugiere, que poliovirus no está ejerciendo una alteración a nivel conformacional del minicromosoma de SV40.

A B R E V I A T U R A S

DNA	Acido Desoxirribonucléico
ENHANCER	Secuencia de Estimulación de la Transcripción
Kd	Kilodalton
Mock	Infección Fingida
Moi	Multiplicidad de Infección
ORI	Región de Origen de Replicación de SV40
p. b.	Pares de Bases
poli-A	Poli-Adenina
RNA	Acido Ribonucléico
RNA _m	Acido Ribonucléico Mensajero
RNA _t	Acido Ribonucléico de Transferencia
RNA _v	Acido Ribonucléico Viral
GC	Secuencia Guanina-Citocina
cap	7mGppp
UFP	Unidades Formadoras de Placa

INTRODUCCION

Durante cualquier tipo de infección viral se modifica el metabolismo de la célula huésped. Estas modificaciones son variables, pueden ir desde una supresión total de la síntesis de macromoléculas (DNA, RNA y proteínas), hasta una estimulación específica de genes celulares (Fernández-Tomás, 1987).

En el caso del virus de la poliomiélitis se ha encontrado que dicho virus inhibe drásticamente la síntesis de proteínas y RNA del huésped y, a tiempos tardíos también del DNA.

El virus de la poliomiélitis pertenece a la familia de los picornavirus (pico = pequeño y rna = ácido ribonucléico) y al género de los enterovirus; cabe mencionar que esta familia constituye el más importante grupo de patógenos humanos. La poliomiélitis es una enfermedad infecciosa que afecta el sistema nervioso central; la entrada de poliovirus es por vía tracto-digestiva; se multiplica primero en la farínge y/o mucosa intestinal y es llevado vía torrente sanguíneo, hasta las células del sistema nervioso central. Las lesiones resultantes son amplias con diferencias en la severidad clínica,

como la poliomielitis espinal (parálisis) que es la más frecuente o la forma bulbar de menor incidencia (Fenner y cols. 1972).

La familia de los picornavirus comprende viriones sin envoltura de 20 a 30 nm. de diámetro con simetría icosaédrica y un contenido de RNA de 29 a 32%. El genoma es una molécula de RNA (RNAv) cadena sencilla de polaridad positiva es decir, posee la misma secuencia que el RNAm, por lo tanto, se traduce, para posteriormente replicarse a RNA polaridad negativa el cual es utilizado como molde para sintetizar las cadenas de polaridad positiva (+) formando el intermediario replicativo (Girard, 1969). Figura 1.

Las cadenas (+) son utilizadas por polio para traducirse y constituir el genoma de las nuevas partículas virales (Baltimore y cols., 1963).

Estructuralmente, la molécula de RNAv posee una proteína ligada covalentemente en el extremo 5' terminal conocida como Vpg (Wimmer, 1979) y una región de 80 a 120 nucleótidos de adenina (poli A) en su extremo 3' terminal.

El RNA genómico, después de que aparentemente, la proteína Vpg ha sido retirada, actúa como RNAm iniciándose la traducción in vivo en un solo sitio, distante 743 nucleótidos del extremo 5' terminal, hasta un sitio

de terminación en el extremo 3' terminal (nucleótido 7361), 73 nucleótidos antes del comienzo del tramo de poli A.

Funcionalmente, polio se traduce a partir de un mensajero monocistrónico para dar lugar a una poliproteína de 247,000 daltones (Darnell, 1967), que sufre un procesamiento secuencial dando lugar a un total de diez polipéptidos, en este proceso intervienen por lo menos dos proteasas codificadas por el virus: 2A y 3C, Figura 2.

Operacionalmente el genoma de polio se divide en tres regiones: P1, P2 y P3 (Semler y cols., 1981). La región P1 codifica para las proteínas de cápside VP1, VP2, VP3 y VP4. La región P2 codifica para tres péptidos: 2A que es una proteasa encargada del rompimiento que permite dejar libre a la poliproteína P1 y también para el rompimiento de 3C' y 3D'; 2B de función desconocida y 2C involucrada en la síntesis del RNAv.

La región P3 codifica para el menos cuatro péptidos: la proteasa 3 CD que participa en el procesamiento de la región P1 (Jore y cols., 1988) y, asimismo el precursor de la replicasa 3D, 3C involucrada en el procesamiento de 3 CD y P2 (Semler y cols., 1983), Vpg (3B) que como se ha mencionado se une covalentemente al extremo 5' del RNA genómico (Flanegan y cols., 1977)

y parece participa en la replicación del RNA_v; y 3A de la cual, no se conoce su función. Alternativamente, el precursor proteico 3 CD, puede procesarse en otro sitio para dar origen a un procesamiento alternativo de dos péptidos: 3 C' y 3 D' poco estudiados (Hanecack y cols., 1984; Pallansch y cols., 1984).

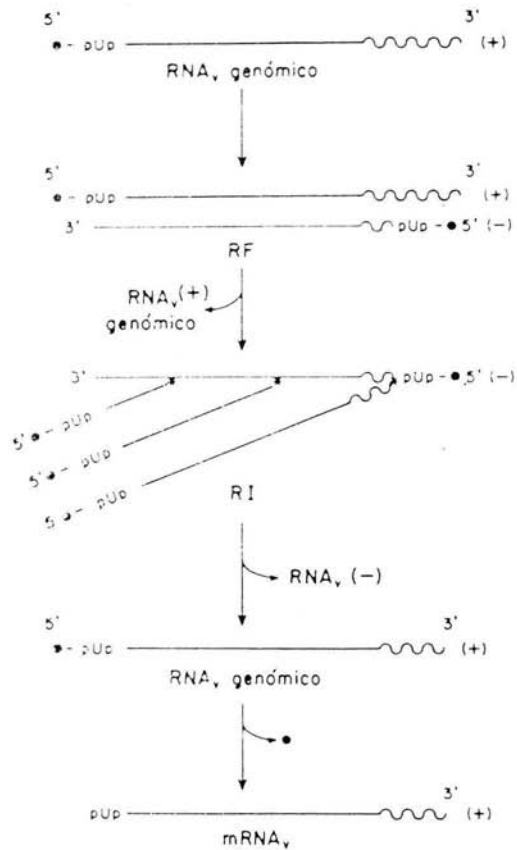


Figura 1

Intermediario replicativo de poliovirus (RI), formado a partir de una cadena de polaridad negativa (-) y que da origen a cadenas positivas (+). (modificado de Girard, 1961).

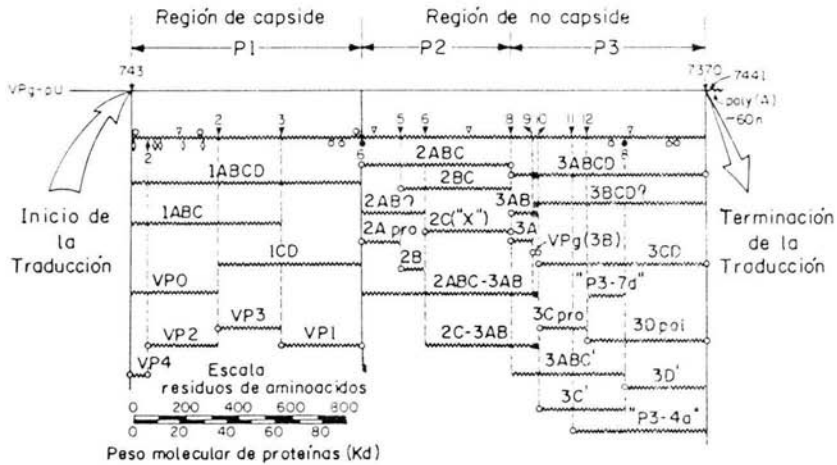


Figura 2

Mapa genómico de poliovirus indicando los péptidos originados durante su procesamiento secuencial.
(Tomado de Nicklin y cols. 1986)

INHIBICION DE LA TRADUCCION

Durante la infección con el virus de la poliomielitis se detecta a nivel celular, una inhibición secuencial de la biosíntesis de macromoléculas. La estrategia seguida por el virus para inhibir la traducción de la célula que infecta radica en dos hechos fundamentales: primero, la inhibición es a nivel de la formación del complejo iniciador de la traducción (Kaufmann y cols., 1976; Ehrenfeld y Manis, 1979) y segundo, no se requiere aparentemente, expresión del genoma viral (Bablanian, 1972).

Ehrenfeld y Manis (1979), han establecido un sistema para detectar el complejo de iniciación de la traducción usando anisomicina que puede estabilizar dichos complejos en las células a altas concentraciones de sal (0.5 M de NaCl), lo que puede disociar los complejos ribosomales que no tienen RNA mensajero e iniciador RNA de transferencia (RNAm y RNAt, respectivamente); con este sistema se observa que los complejos 80S son disociados tras la entrada de polio a la célula y reformados después de la síntesis de RNA viral; además, se observa que al tratar a las células infectadas, con guanidina, se puede restablecer la población de los

complejos tras la supresión de la replicación del RNAm viral causada por la droga.

Se ha reportado también una desagregación de polirribosomas celulares (Penman y cols., 1963; Colby, 1974) y la asociación posterior del RNA viral en los denominados polirribosomas virales. Lo anterior se ha establecido realizando experimentos con células HeLa y poliovirus. Tales experimentos consisten en detectar los valores de sedimentación de ribosomas celulares libres y asociados con RNAm, encontrándose para los primeros una población de 74S y para los segundos de 200S.

Por otro lado, la aparición de polirribosomas virales tras la desaparición de los celulares se ha establecido mediante el tratamiento con actinomicina a estos cultivos, dado que si se detecta algún tipo de síntesis de proteínas serán codificadas por el virus ya que posee RNA como material genético y la actinomicina no afecta su replicación.

Conforme a los estudios de sedimentación se encontró que los polirribosomas celulares tienen un valor promedio de 200S mientras que los virales presentan un coeficiente homogéneo de 400S. Por otro lado, durante la infección la velocidad de alargamiento durante

la síntesis de la cadena polipeptídica es constante y el RNAm permanece estable (Leibowitz y Penman, 1971).

Durante la infección con Poliovirus se detectan cambios en la permeabilidad de la membrana celular ocasionando una acumulación de Na⁺ intracelular (Sánchez, 1983; Contreras y cols., 1981; Alonso y Carrasco, 1981), habiéndose propuesto que esta modificación desencadena la inhibición de la traducción del RNAm del huésped y favorece la traducción del RNAm viral. Al parecer, una vez que el virus entra a la célula, provoca modificaciones en la permeabilidad de la membrana plasmática. En experimentos más recientes se ha llegado a la conclusión de que probablemente estos cambios reflejan la interacción de un componente del virión con la membrana celular. Es evidente entonces, que las condiciones hipertónicas intracelulares favorecen de alguna manera al RNAm viral haciendo que tenga ventajas sobre el celular para su traducción; esto se ha probado cambiando las condiciones del medio observándose que tras el paso de medio de cultivo hipertónico a hipotónico, la producción de proteínas virales es bloqueada aún cuando se use un amplio rango de multiplicidades de infección (Moi) (Alonso y Carrasco, 1981).

Por otro lado, existe abundante evidencia en la literatura que apoya la inactivación del factor

que reconoce al residuo de 7 mGppp (cap), no presente en el RNAm viral, en células infectadas (Ehrenfeld, 1982). Rose y cols., (1978) han detectado la inactivación del factor eIF-4B identificado como uno de los reconocedores del residuo 7mGppp (cap) en el extremo 5' terminal para el inicio de la traducción. Este resultado es apoyado por los experimentos de Ehrenfeld quien en 1982 utilizando ese sistema identificó al mismo factor como defectivo y logró restaurar su actividad mediante la adición de un extracto de reticulocito de conejo al sistema.

Recientemente se ha encontrado que el complejo de proteínas que se une al residuo 7mGppp (cap) en células infectadas se encuentra inactivo, aparentemente por degradación de un polipéptido de 220 Kd. que forma parte del complejo (Etchison y cols., 1982). La degradación se lleva a cabo por una proteasa no codificada por el virus (Ehrenfeld y Lloyd, 1985; para una revisión más reciente ver Sonenberg Nahum en *Advances in Virus Research*. vol. 33, 1987).

Por otro lado, tras incubación en la región traducida 5' terminal de poliovirus con factores citoplasmáticos celulares, Del Angel y cols. (1989), encontraron que dos zonas en esta región del genoma viral (1-250 y 320-629) interaccionan con factores de iniciación de la

traducción (presentes en el lavado ribosomal). Uno de los factores involucrados es el factor eIF-2 α . Esta interacción puede participar en el proceso de traducción del RNA mensajero viral.

INHIBICION DE LA TRANSCRIPCION

Como se mencionó anteriormente, durante la infección con poliovirus se detecta también una marcada inhibición en la síntesis de RNA en la célula huésped. Este fenómeno fue descrito en primera instancia por Salzman y cols. (1959), Martin y cols. (1962) y Franklin y Baltimore (1962). Más tarde, los estudios se ampliaron utilizando distintas líneas celulares y varios miembros del grupo Picornavirus (Zimmerman y cols. 1963).

Así, por ejemplo, Bienz y cols., (1978), han realizado estudios probando células HeLa, Hep 2, Vero y L, infectándolas con Polio y Mengovirus observándose un patrón general de decremento de RNA celular: decremento lineal en la síntesis de esta macromolécula, teniendo como excepción sólo a las células L infectadas con Mengovirus, pues aquí, el decremento en la síntesis de RNA celular es exponencial.

Tras un estudio específico con células HeLa y L y Polio y Mengovirus se observa, durante la síntesis de RNA y proteínas celulares que usando cantidades similares de virus, células y material radiactivo (^{14}C -uridina para RNA y ^{14}C -leucina para proteínas) la cantidad de RNA sinte-

tizado en células L es menor que en las HeLa después de la adición en ambos sistemas celulares de Mengovirus; en cuanto a la síntesis de proteínas el resultado, si bien similar, es mucho más marcado; esto puede ser debido a que en el momento del bloqueo de la traducción existe en ambos tipos celulares una poza de RNAm listo para traducirse que es mucho más grande en células HeLa; ello probablemente por el más rápido metabolismo que poseen éstas con respecto a las L, lo que les permite producir más cadenas de RNA.

Todo esto indica que las observaciones en la síntesis de RNA y proteínas no son cien por ciento debido al virus ya que intervienen también los mecanismos intrínsecos del tipo celular con el que se esté trabajando (McCormick y Penman, 1967).

Ensayos de transcripción in vitro con núcleos íntegros de células L y Mengovirus han demostrado que la transcripción inicialmente afectada es la dependiente de la RNA polimerasa II (Miller y Penhoet, 1972) mientras que la catalizada por las RNA polimerasas I y III son afectadas en menor proporción y a tiempos tardíos de la infección (Schwartz y cols., 1974). El mecanismo inicialmente sugerido fue por la probable interacción entre algún producto del virus con el DNA o proteínas asociadas a la cromatina empleada o con la RNA polimerasa

responsable de la actividad sintética (Apriletti y Penhoet, 1974), ya que no hay cambios detectables en los patrones de metilación, poliadenilación y adición del CAP del RNAm (Fernández Muñoz y Darnell, 1976).

También se ha reportado que disminuye el número de RNA polimerasas II unidas al templado conforme la infección progresa (Flores-Otero y cols., 1982) y que la subunidad mayor (IIo) la RNA polimerasa II0, es modificada durante la infección de la célula con polio (Rangel y cols., 1987). Aún cuando no se sabe el mecanismo con detalle se sugiere que puede deberse a un bloqueo en la unión de las enzimas, a una liberación prematura entre el templado y la polimerasa o una modificación en las enzimas utilizadas en el proceso. Esta conclusión se basa en que se observa una reducción significativa en cuanto a la cantidad de RNA polimerasa II0 (una de las subespecies que conforman a la RNA polimerasa II) después de la infección, lo que apoya nuevamente la teoría de que polio induce la inhibición de la transcripción de la célula huésped a nivel de inicio de la cadena de RNA (Rangel y cols., 1987).

Por otra parte, Crawford y cols., (1981), reportaron que extractos celulares provenientes de células infectadas carecen al menos de un factor requerido para la iniciación específica de la transcripción ya que al pre

parar estos extractos a 3 horas post-infección se observa en ellos una inhibición específica de la transcripción, y al agregar a éste sistema una preparación de factores de transcripción se restaura la actividad de la polimerasa. Para probar que el factor o factores han sido modificados o degradados por el virus durante la infección, los autores han mezclado el extracto de células infectadas (con transcripción inactiva) con un extracto de células no infectadas observando que hay un reinicio del proceso transcripcional.

Lazard y cols. (1989) en estudios realizados con la región del promotor tardío de Adenovirus 2 (secuencia UPE) y con extractos nucleares, de células HeLa infectadas con polio, han reportado que hay una modificación en la unión de la secuencia UPE con el factor estimulador de la transcripción (USF) contenido en los extractos nucleares por lo menos en condiciones normales; esta modificación coincide con la inhibición de la síntesis de RNA mensajero celular en ensayos in vivo e in vitro. Adicionalmente, los autores reportan la detección de un polipéptido de 50 Kd de inducción o modificación viral, que aparece en el extracto nuclear con tres horas de infección con polio y que se une específicamente a la secuencia UPE, en contraste con el polipéptido normal: de 46 Kd.

En cuanto a la inactivación de las polimerasas tras la infección con polio se sabe que ésta ocurre a diferentes tiempos para cada una de las enzimas; así, se tiene que para la polimerasa II la inhibición de su actividad se detecta, aproximadamente, a las tres horas de iniciada la infección. La inhibición de la síntesis de RNA pre-ribosomal por la RNA polimerasa I se sabe ocurre a tiempos muy tempranos de la infección en células HeLa infectadas con Poliovirus (Contreras y cols., 1973), sin embargo, también es conocido que en células L infectadas con el virus de la encefalomiocarditis, la inhibición de las RNA polimerasas I y III se realiza un poco más tarde con respecto a la polimerasa II (Fradkin y cols., 1987).

La estabilidad del RNAm celular no se modifica (Colby y cols., 1974; Franklin y cols., 1962, Leibowitz y Penman, 1971).

Así mismo, se ha encontrado que durante la transcripción de la RNA polimerasa III los factores específicos para tal proceso, TFIIIA, TFIIB y TFIIC, se ven afectados de manera diferencial por la infección con polio, correspondiendo un grado mínimo de afectación para TFIIIA y un grado máximo o severo a TFIIC, para TFIIB se ha encontrado una afectación poco evidente (Fradkin y cols., 1987). Para determinar esta cinética se reali-

zaron experimentos en los que se usaron extractos crudos libres de células (S 100) preparados con células infectadas con polio y de forma fingida (mock). La transcripción específica de la polimerasa III se ensayó usando un plásmido con el gen VAL de Adenovirus tipo 2 cuya transcripción correcta produce un transcrito de 160 nucleótidos. Como resultados de estos experimentos se observó que la actividad para generar transcritos del extracto preparado con células infectadas va disminuyendo progresivamente a partir de la tercera hora post-infección y esto se ha explicado por la ausencia del factor TFIIC en dichos extractos. Además, se examinó si este decremento en los transcritos de VAL en los extractos infectados era debido a una nucleasa; para esto, los autores midieron la estabilidad de los transcritos tanto en las células mock como en las infectadas con polio, los resultados fueron que los transcritos permanecieron estables durante 90 minutos a 30°C. Estos resultados llevaron a la conclusión de que la inhibición de la transcripción de VAL en extractos de células infectadas con Polio es debida a un defecto en el nivel de síntesis de RNA y no a un decremento en la estabilidad de los transcritos (Frackin y cols., 1987).

También es conocido, que las RNA polimerasas II y III solubilizadas de células infectadas conservan

la actividad transcripcional al ser ensayadas con un templado exógeno (Schwartz y cols., 1974); en relación a esto, se han realizado estudios en los que se extrajeron las RNA polimerasas I, II y III de células infectadas poniéndolas, posteriormente, en otros sistemas con diferentes templados en los que se ha visto, recuperan su actividad, la completa recuperación de ésta se observa al tratar a las células infectadas con cicloximida inhibiendo de este modo la síntesis de proteínas y probando que no es ésta la causa de inhibición de la síntesis de RNA (Apriletti y Penhoet, 1974).

Así mismo, se ha establecido que, para que se detecte el efecto supresor, se requiere de la acumulación de productos virales (Penman y cols., 1963).

Baltimore y cols., (1963), establecen una comparación entre células L infectadas con Mengovirus tratadas y no con puomicina y p-fluorofenilalanina, dichos compuestos como se sabe, impiden la traducción en células normales. Por parte de la puomicina se debe a que posee una estructura similar a la de un derivado aminoacilo del resto adenílico, terminal de un RNAt, por lo que interrumpe la prolongación de la cadena por su capacidad de unirse al centro A cuando el P está ocupado formando un derivado convalente peptidil-puomicina que se disocia del ribosoma por no poseer la estructura precisa para ser reconocida por el aparato

de traducción y ser trasladada al centro P. Por otra parte, la inhibición provocada por la p-fluorofenilalanina en la síntesis de proteínas se debe a que es un análogo de la fenilalanina y puede sustituirla en la elongación de la cadena aminoacídica, lo cual es anormal (Lehninger, A., 1982). De entre sus resultados se obtiene que tanto la puromicina como la p-fluorofenilalanina suprimen los efectos inhibitorios causados por el virus, lo cual, constituye una fuerte evidencia de que la inhibición de la síntesis de macromoléculas es debida a los polipéptidos formados durante la infección viral, y se ha visto que dichos polipéptidos se encuentran tanto en células tratadas con actinomicina como en las no tratadas con ella por lo que sólo pueden ser productos del virus.

Por otro lado, Fernández-Tomás (1982) también ha detectado polipéptidos en núcleos aislados de células HeLa infectadas con polio; tales polipéptidos han sido identificados como dos pequeñas proteínas: P66 y P45 y una más grande, P75 que al parecer y por marcaje, se ha determinado que es precursor de las dos anteriores. Fernández-Tomás sugiere que estos productos pueden modificar la actividad de las RNA polimerasas adheridas al templado de DNA para la transcripción celular.

Bienz y cols., (1982), han demostrado también que esta acumulación de proteínas virales en células infectadas con polio se detecta tras la penetración

del virus a la célula; comprobando además, que tal acumulación es de manera diferencial en el citoplasma y el núcleo de células infectadas y que dicha diferenciación está determinada por la afinidad de las proteínas virales por las estructuras nucleares. Dentro de las proteínas encontradas de manera preferencial en el núcleo están los precursores de VP1 y, dentro de los que se localizan en el citoplasma los de VP3 y 3D' (Bienz y cols., 1982).

Bossart y cols. (1984), ha detectado el mismo resultado al analizar núcleos aislados de células Hep 2 no infectadas con extractos citoplasmáticos infectados con polio y Apriletti y Penhoet (1974) en células L infectadas con Mengovirus.

Igualmente, se ha postulado que alguna proteína viral o lipoproteína, actúa como inhibidor de la transcripción celular (Balandin y cols., 1964; Ho y Washington, 1971; Bienz y cols., 1982). Ya que se le ha detectado, poco después de que el virus ha penetrado (2 horas post-infección); en un principio no se conocía la naturaleza de este inhibidor sugiriéndose que se trata de una lipoproteína de origen viral ya que al tratarla con fosfolipasas y calor pierde su actividad inhibitoria, sucediendo lo mismo al ser tratado con puromicina y p-fluorofenilalanina, además de presentar insensibilidad a las ribonu-

cleasas y a las enzimas proteolíticas, así como el hecho de extraer sus componentes con solventes orgánicos.

Bienz y cols. (1982), sugieren que este inhibidor es un producto viral de los que ellos mismos han detectado como sintetizado en el citoplasma y transportado al núcleo.

En otros estudios (Núñez, V. 1985) se ha encontrado una proteína inducida por el virus de la polio asociada a la cromatina celular, con alta afinidad por DNA denominándosele PAD 35 (Núñez, V. 1985); igualmente, se reporta la disminución gradual de una proteína celular de peso molecular parecido a la anterior pero al parecer un poco más básica y de baja afinidad por DNA (Pc 35).

Estos resultados apoyan los obtenidos por otros investigadores (Crawford y cols., 1982) en relación a la falta de un factor necesario para la iniciación específica de la transcripción, ya que la disminución gradual de Pc 35 reportada por Núñez, V. (1985) coloca a éste péptido como posible factor de iniciación y blanco de la infección. Por otro lado, también se apoyan los resultados de Baltimore y cols. (1963), Balandin y Franklin (1964) y Fernández-Tomás (1982), entre otros sobre la presencia de un inhibidor inducido viralmente (PAD 35) (Núñez, V. 1985).

Recientemente, Rangel y cols. (1988). en estudios realizados con células HeLa y polio, han bloqueado

la síntesis de productos virales mediante el tratamiento de las células infectadas con cicloheximida y con cloruro de zinc, observando que el efecto inhibitorio causado por el virus sobre la transcripción celular es anulado, ésto, apoya la idea de que es un producto viral lo que provoca la inhibición de la transcripción celular dado que al no haber síntesis de productos virales hay un comportamiento similar de las células infectadas con las control no infectadas.

Holland y Peterson (1964), por otro lado, reportan que el templado utilizado por la RNA polimerasa no se encuentra modificado, estos estudios sin embargo, no contemplan la posibilidad de cambios en la estructura conformacional de la cromatina celular.

Una de las características principales de las células eucarióticas es la enorme cantidad de DNA (aproximadamente 3×10^9 p.b.) en forma de cromatina. Por ello en años recientes se han utilizado sistemas más sencillos.

Así, se tienen ya establecidos varios sistemas modelo que han ayudado a elucidar los problemas planteados dentro de la biología molecular. Como ejemplo de esto se tienen los estudios con bacteriofagos realizados por Hershey sobre DNA y como vehículos de clonación para estudiar mecanismos de regulación celular; dentro de los virus animales empleados como herramienta para

investigar los mecanismos de regulación involucrados en la traducción, transcripción y replicación de células eucariotas, se tienen los estudios de replicación de DNA con Poliomavirus; procesamiento de RNA (splicing) usando Adenovirus; regulación de la transcripción empleando DNAs virales; SV40 para clonaciones eucarióticas en fusiones celulares con el virus Sendai y en transformación celular.

Manley y cols. (1980), han desarrollado un sistema que consiste en un extracto celular derivado de células HeLa concentrando y dializado, con pequeñas moléculas y factores necesarios para la transcripción requiriendo tan sólo DNA exógeno. La concentración de este extracto es importante para la iniciación correcta de la transcripción ya que se ha visto que, aplicado a altas concentraciones puede suprimir el proceso y a muy bajas da como resultado la producción de una elevada cantidad de RNAs heterogéneos.

Con la utilización de este extracto, Handa y cols. (1980), han trabajado en la determinación correcta y completa de los sitios de inicio de la transcripción de genoma de SV40, al cual emplean como templado en el sistema de Manley antes mencionado.

Igualmente, Davison y cols., (1983), han realizado estudios de la interacción de factores con

secuencias del promotor para formar los complejos de preiniciación para el proceso de transcripción. De esta manera se han encontrado dos sitios de inicio de la transcripción de este virus, localizados a 0.655 y 0.67 en su mapa, estos resultados sugieren que sólo algunos de los sitios usados por los promotores in vivo durante cada uno de los estados de infección son empleados in vitro, además de que hace suponer que el extracto de células HeLa reconoce algunas secuencias del sitio del promotor para la síntesis de RNAs mensajeros tardíos. Así mismo, se han detectado en este virus dos clases de RNA mensajeros tardíos de secuencia heterógena.

Por otro lado, Djan y Tjian, (1985), por ejemplo, han utilizado el "enhancer" (secuencia de estimulación de la transcripción) de SV40 como prototipo de los sistemas de transcripción en eucariotes, encontrando de este modo una proteína, SP 1, que juega un papel directo en la transcripción viral de la cadena opuesta o complementaria de DNA, además de los factores transcripcionales; tal proteína se extrae de cultivos celulares humanos y posee una interacción directa con las secuencias requeridas para la respuesta transcripcional, esto es, las secuencias ricas en GC hacia la izquierda de la caja TATA; así mismo, los autores han determinado que no es este el único sitio de unión, sino cualquiera a lo largo del genoma de SV40 siempre que presente secuencias

GC. La cantidad de sitios de unión de SP 1 marca la facilidad relativa que puede tener el virus para infectar a la célula.

Así mismo, Sassone-Corsi y cols. (1985), sugieren que los factores de transactivación o estimuladores de la actividad del "enhacer" están involucrados no sólo en esta secuencia, sino también en las regiones 5' y 3' de la cadena de DNA a transcribir.

Así, se sugiere que los experimentos de estimulación in vitro reflejan la actividad del "enhacer" in vivo.

De igual manera, se han estudiado los complejos nucleoproteicos de SV40 por microscopía electrónica. Dichos estudios han dado como resultado, el conocimiento de tres formas diferentes de estructuras nucleoproteicas del genoma tras su introducción en la célula huésped, tales formas se han denominado: a) complejo I, aquel que se forma poco después de que SV40 ha penetrado en la célula huésped; b) complejo II, formado a partir del I poco después de que se completa la replicación de DNA de SV40, lo que da como resultado la inhibición de la actividad biosintética del complejo I y c) los viriones maduros en la etapa final (Fernández Muñoz y cols., 1979).

La cromatina viral llamada minicromosoma, ha sido aislada a tiempos tardíos de la infección y utilizada como templado para dirigir la transcripción in vitro. Este sistema ha sido estudiado por Beard y cols. (1982), quienes además de la cromatina viral han obtenido el DNA desnudo del virus; al ensayar la transcripción con los templados anteriores, estos autores han encontrado un índice de transcripción mayor para el promotor tardío (esto es, transcripción tardía) en los tres ensayos y, además, al comparar los resultados entre uno y otro caso se ha visto que la mayor definición, y por lo tanto cantidad de transcritos tardíos, se obtiene en el ensayo en el que se utiliza DNA desnudo como templado.

En otro reporte, Tack y cols. (1985), utilizando el mismo modelo de Beard y cols. han determinado que el patrón de transcripción del minicromosoma de SV40 no se ve afectado, relativamente, por los cambios de concentración del templado adicionado al sistema; los autores prueban además, que predomina el RNA tardío en todas las concentraciones probadas; así mismo, se ha observado un tiempo óptimo de síntesis de transcritos tempranos y tardíos de RNA tras la infección con SV40, ubicado entre las 34 y 40 horas post-infección. La terminación del proceso de transcripción, alrededor de las 46 horas p.i., parece ser debido a que existe un número determinado de moléculas a transcribir y,

una vez cubierto éste no importa cuántas moléculas más queden en el sistema, éstas ya no se transcriben; es probable asimismo, que, a períodos tardíos, aparezcan factores virales inhibitorios que se unan al templado impidiendo de este modo la continuidad de la transcripción.

Para explicar la regulación de la actividad de los promotores temprano y tardío, Tack y cols. (1985), han propuesto dos mecanismos: a) uno mediado por una subclase de antígeno T que se une al cromosoma causando una represión en la actividad del promotor temprano sin afectar en modo alguno al tardío y b) otro ejercido por una fuerte unión entre un factor trans-activador (localizado en los sobrenadantes de los cultivos de las células CV-1 infectadas con SV40) y una estructura nucleoproteína estable que favorece la transcripción tardía sobre la temprana aproximadamente en un factor de 10 veces.

Robbins y cols. (1986) han encontrado mediante la construcción de diferentes plásmidos combinando los sitios de los promotores temprano y tardío así como la secuencia del "enhacer" de SV40 y el gen de la timidina cinasa de herpesvirus, que hay una especificidad del "enhacer" de SV40 que se podría explicar por dos posibles modelos: i) que la secuencia "enhacer" no tenga un efecto determinante sobre el gen a transcribir y ii) que la habilidad de esta secuencia para estimular la expresión del gen

dependa de interacciones precisas del gen, de factores de transcripción específicos y el "enhacer". Los autores (Robbins y cols., 1986), estudiaron además la estimulación de la transcripción por el antígeno T (Ag T) encontrando que los efectos de éste son indirectos y no es necesaria su presencia de manera constante y continua para que se lleve a cabo la transcripción (Borowiec y cols., 1988).

En otros experimentos con adenovirus EA se ha visto que éste puede activar la transcripción de ciertos genes celulares y virales, aparentemente de manera independiente del "enhacer" (Robbins y cols., 1986).

Otros experimentos con SV40 han sido enfocados a determinar los sitios de terminación de la transcripción. En cuanto a la transcripción temprana se sugiere que, in vitro, puede finalizar en algún sitio comprendido en el origen de la replicación del genoma viral, así mismo, se ha encontrado que las cadenas de RNA sintetizadas son de longitudes diferentes, lo que habla de un sitio de término heterogéneo o múltiple. Otro dato importante que se ha determinado es que las secuencias ricas en timidina pueden ser importantes en el proceso de terminación de la transcripción como se ha observado en levadura, β -globina humana, entre otros; dentro de la cadena

temprana de SV40 se han localizado al menos tres fragmentos cuyas secuencias constan de 4 ó más residuos de timidina, la localización de estos segmentos está específicamente dentro de la región ORI lo que apoya los datos anteriores (Grass y cols., 1987).

ESTUDIOS CON EL MINICROMOSOMA DE SV40

Este tipo de sistemas ha permitido abordar el funcionamiento del minicromosoma bajo diferentes circunstancias. Recientemente Díaz Moreno (1983), al estudiar la actividad transcripcional de minicromosomas de SV40 aislados de células CV-1 superinfectadas con el virus de la poliomielitis, reportó que dicha actividad está inhibida.

El modelo establecido por Díaz Moreno se realizó tomando en cuenta las características estructurales y funcionales del complejo de transcripción, dependiente de la RNA polimerasa II del huésped del virus SV40 que, como hemos mencionado, puede ser considerado como un gen eucariótico. Este sistema de coinfección con polio requiere de altas multiplicidades de infección por parte de éste sobre el ya establecido CV-1/SV40, puesto que existen dos hechos que deben tomarse en cuenta para toda coinfección: i) el que puedan existir modificaciones en la membrana plasmática ocasionados por la infección previa con SV40, lo que puede disminuir la efectividad

de polio en el reconocimiento del receptor específico o en la penetración y ii) el que la infección con SV40 pueda desencadenar mecanismos celulares o virales que supriman la expresión de un segundo virus.

Los mecanismos de transcripción de los complejos CV-1/SV40 y CV-1/SV40/POLIO, fueron comparados por el autor encontrando que polio inhibe específicamente la transcripción de SV40; tomando como control el complejo transcripcional de CV-1-SV40 se observa una actividad óptima a las 39 horas p.i. mientras que el complejo transcripcional obtenido del sistema CV-1-SV40-polio alcanza sólo un 60% de actividad después de 3 horas de coinfección y un 50% a las 6 horas.

RACIONAL

Dado que nosotros estamos interesados en estudiar el mecanismo por el cual Poliovirus inhibe la transcripción celular y puesto que Holland y Peterson (1964) mostraron que no se detecta modificación en la estructura conformacional de la cromatina de la célula huésped tras la infección con este virus, el objetivo del presente trabajo fue estudiar si existen modificaciones a nivel del minicromosoma de SV40 durante la coinfección.

El estudio de la configuración espacial del minicromosoma de SV40 en células superinfectadas con polio se ve ayudado en gran medida por las técnicas de corte con enzimas de restricción y observación de dicho minicromosoma por microscopía electrónica, ya que como se sabe, la actividad de las enzimas de restricción es mayor en aquellas secuencias de DNA que presentan una estructura más distendida que en las que se presentan de manera compacta, debido a la exposición mayor de los sitios de corte de las primeras. En un estudio reciente (Weiss y cols., 1987) se ha encontrado que la región ORI (libre de nucleosomas) y la región del promotor tardío de los minicromosomas de SV40 pueden ser más sensibles al corte de las enzimas de restricción que la región 5' de los genes tempranos; estos resultados sugieren que las regiones media y 5' terminal de los genes tempranos de los complejos transcripcionales de SV40, aislados en infección tardía a fuerzas iónicas bajas o fisiológicas son estructuras con una conformación más compacta que el resto del genoma.

ORIGEN DE LOS MATERIALES

Baker. Fosfato de sodio monobásico; fosfato de potasio dibásico; cloruro de potasio; dextrosa; carbonato de sodio; glicerol; ácido tri-cloro acético; ácido bórico; tolueno.

Fethesda Research Laboratories (Bethesda Md. EUA) (BRL). Agarosa; ditiotriethol; cloruro de cesio.

BDH. Dodecil sulfato de sodio.

Carbiochem (EUA). Bromuro de etidio.

HyClone. Suero de ternera.

Difco. Agar noble.

Farmaceútica Lakeside (México). Penicilina; estreptomicina.

Gibco Lab. (EUA). Medio Dulbecco.

Merck. Cloruro de sodio; etilendiamin ácido tetra-acético disódico; rojo de fenol; etanol; deoxicolato, metanol.

Packard. 2, 5- Difeniloxazol (PPO).

Sigma chemicals Co. (EUA). Tripsina; hepes; tris-base; tritón x-100; rojo neutro; tris-HCl; Trietanolamina; fenil-metil-sulfonil-fluoruro.

Whatman. Papel whatman 3 MM.

Kodak. Película Royal Pancromática; X-Omat, K.

Material radiactivo: Amersham, Inglaterra. -
Metil ³H-timidina.

Enzimas de restricción (Bgl I, EcoRI y PstI)
Amersham, Inglaterra.

Líneas celulares y virus: Células CV-1 derivadas de riñón de mono propagadas en el Laboratorio 23 del Departamento de Genética y Biología Molecular CINVESTAV IPN.

El virus de la poliomiелitis (Mahoney tipo I) y el virus SV40 (cepa 777) fueron propagados a baja multiplicidad en células HeLa y CV-1, respectivamente.

El virus SV40 fue proporcionado por el Dr. Patricio Gariglio del Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN y el de la poliomiелitis fue obtenido del laboratorio del Dr. David Baltimore.

PREPARACION DE SOLUCIONES, MEDIOS DE CULTIVO
Y AMORTIGUADORES.

- En la preparación de todas las soluciones, amortiguadores y medios de cultivo se uso agua bidestilada (A.B.) y se esterilizaron por autoclave (E.A.) 22 libras/cm² de presión, 120°C durante 20 minutos o por filtración (E.F.) usando membranas millipore tipo GS (0.22 um y 0.45 um).

- Medio Dulbecco 1X. Se disolvió el contenido de un paquete comercial en 890 ml de A.B. estéril, agregando 3.7 g de bicarbonato de sodio y 3.5 g de dextrosa, con CO₂ gaseoso se ajustó el pH a 7.4 y se esterilizó por filtración (E.F.).

- Medio Dulbecco completo (10% suero). Por cada 890 ml de medio Dulbecco 1X se adicionaron 100 ml de suero de ternera y 10 ml de penicilina-estreptomycin 100X.

- Medio Dulbecco 2X. Para preparar este medio que es 2 veces concentrado, se realizó lo mismo que al preparar el medio 1X pero con la mitad del volumen.

- Amortiguador de fosfato salino (PBS). Los siguientes reactivos se disolvieron en A.B., NaCl 137 mM, KCl

3 mM, Na_2HPO_4 2 mM y KH_2PO_4 2mM, ajustando a pH de 7.4 antes de aforarse. E.A.

- Solución de penicilina-estreptomicina (100X). Se disolvieron 5×10^6 unidades de penicilina G sódica y 5 g de estreptomicina en A.B. estéril, aforándose a un litro. E.F. Se almacenó a -20°C hasta su uso.

- Solución de tripsina 0.05%-EDTA 0.02%. Se disolvieron los siguientes reactivos en A.B. estéril: NaCl 8 g. KCl 0.4 g, dextrosa 10 g. NaHCO_3 0.58 g, tripsina 0.5 g, EDTA 0.2 g, rojo de fenol al 0.5% 0.5 ml; se ajustó el pH a 7.4; se aforó a 1000 ml; E.F. y se almacenó a -20°C hasta su uso.

- Solución de rojo de fenol al 0.5%. Se disolvieron 0.5 g de rojo de fenol en 75 ml. de A.B. estéril con la ayuda de calor y 1.5 ml de NaOH 1N, aforando a 100 ml; E.F. en papel Whatman 1 MM y se almacenó a -20°C .

- Solución de rojo neutro al 0.5% 0.5 g del colorante se disolvieron y aforaron en 100 ml de A.B. estéril; E.F. en millipore 0.45 μm . Se almacenó a 4°C .

- Solución de agar 0.9% para plaqueo de SV40. Para preparar 50 ml de agar al 0.9% se emplearon 25 ml de agar noble especial al 1.8% y 25 ml de medio Dulbecco 2X suplementado con 5% de suero de ternera y penicilina-estrep

tomicina. Esta mezcla se preparó a 45°C y se conservó a esta temperatura hasta su uso sobre la monocapa de células.

- Buffer de lisis. (Tritón x-100 0.25%, Tris-HCl pH 7.9 10 mM, EDTA 10mM, NaCl 0.4 M, Sarkosyl 0.4%). Por -- cada 100 ml se usaron: 0.25 ml de Tritón X-100, 1 ml de Tris-HCl pH 7.9 1 M, 4ml de EDTA 0.25 M, 8 ml de Sarkosyl 10%.

- Buffer hipotónico (Buffer H). Se mezclaron las siguientes soluciones: Hepes 10 mM, KCl 5 mM, DTT 0.5 mM, EDTA 1 mM, aforando a 100 ml se almacenó a 4°C.

- Colchón de glicerol. Se tomaron 30 ml de glicerol y se llevaron a 100 ml con Buffer H. Almacenándose a 4°C hasta su uso..

- Mezcla de centelleo líquido (Tolueno-Tritón I). Para preparar 1000 ml de esta mezcla se disolvieron 6 g. de PPO en 600 ml de Tolueno y 400 ml de Tritón X-100

- Amortiguador Tris-Boratos (TBE) 10X. Se disolvieron 108 g de Tris-Base 89 mM, 55 g de Acido Bórico 89 mM y 9.3 g de EDTA 2.5 mM, en 800 ml de A.B. estéril, se ajustó el pH a 8.3 y se aforó a 1000 ml.

- Soluciones para la extracción de Minicromosomas ca. SV40 (Varshavsky y cols. 1978).

I. NaCl 0.14 M y Tris HCl 1 mM pH 6.8

II. Tritón X-100 0.25%, EDTA 10 mM, TEA-HCl 10 mM pH 6.8, PMSF (en etanol) 1 mM.

III. Tritón X-100 0.25%, EDTA 10mM, TEA-HCl 10 mM pH 6.8 PMSF 1 mM, NaCl 0.12 M.

IV. Tritón X-100 0.25% EDTA 10 mM, TEA-HCl 10 mM pH 8.0, PMSF 0.1 mM, NaCl 0.12 M.

Las cantidades para las soluciones II, III y IV - de los elementos indicados son a concentración final.

- Preparación de Geles 1% 1 gr. agarosa normal, se disuelve en 100 ml de buffer TBE 1X (10 ml de TBE 10 x y 90 ml de A.B.).

METODOLOGIA

I. Mantenimiento de línea celular CV-1.

Las células CV-1 confluentes de una caja P-100 (1×10^7 células/cja) fueron lavadas una vez con PBS 1X - estéril luego de retirárseles el medio de cultivo en el que se encontraban, todo se hizo con mucho cuidado para no desprender la monocapa; posteriormente se les agregó 5 ml de tripsina-EDTA y se esperó de 3 a 5 minutos a que la capa se desprendiera de la caja; la tripsina-EDTA fue retirada y las células recogidas con 10 ml de medio Dulbecco completo; las células se pasaron a un frasco donde se aforaron (1×10^7 células en 30 ml de medio Dulbecco completo); se mezcló bien la solución de células y luego se repartió en 3 cajas P-100 estériles de plástico desechables. Este procedimiento se siguió varias veces hasta obtener un número suficiente de cajas P-100 con células confluentes (aproximadamente 10 cajas para realizar la infección con SV40 y la coinfección con Poliovirus.

11. Purificación de Viriones SV40, modificado por Brady y cols, 1980.

Se realizó una infección con SV40 en células - CV-1; Las células (1×10^7) células CV-1/ caja P-100) fueron lavadas con PBS 1X estéril e infectadas con 10 UFP/célula del virus SV40 (título de virus 6×10^5 UFP/célula); tomando 10 ul de solución de virus SV40/caja, disueltos en 0.5 ml de medio Dulbecco suero menos (sin suero); con el fin de que el virus se adsorbiera, las cajas se movieron cada 20 minutos durante una hora y mantenidas a 37°C, 10% CO₂ en este mismo tiempo. Después de estos 60 minutos, se agregó a las células 10 ml/caja de medio Dulbecco 2% suero y se dejaron incubando durante 7-9 días a 37°C, 10% CO₂.

Después de este tiempo, las células y el medio de cultivo se colectaron y centrifugaron a 39 000 rpm durante 3 horas (rotor 50 Ti, ultracentrifuga Beckman LB-55) a 4°C, el sobrenadante se desechó y la pastilla de virus se resuspendió en 10 ml de PBS estéril, esta solución se sonicó por 30 segundos a 8.5 microns, enfriando la solución en hielo cada 15 segundos. La solución resultante se llevó a una concentración final de 1.3% de desoxicolato de sodio y 0.0125% en tripsina y se incubó a 37°C por 30 minutos. Después, la solución se colocó a 4°C durante 10 minutos y se centrifugó a 10 000 rpm, a 4°C por 10 minutos (centrífuga Sorvall RC-2B). El sobrenadante se colocó en un colchón de cloruro de cesio de densidad

1.38 g/ml y centrifugado 12 horas a 24 000 rpm y 4°C (rotor SW28, ultracentrífuga Beckman LB-55); la banda viral (debajo de la interfase) se colectó y se llevó a una densidad de 1.2 g/ml con PBS estéril, las bandas virales se colectaron y se dializaron contra amortiguador Tris-HCl - 0.01 M pH 7.4 horas; el virus se almacenó a -20°C.

III. Titulación de SV40, método de UFP.

24 horas antes de la infección con SV40 las células CV-1 se sembraron en cajas de 60 mm. estériles, desechables, (3×10^6 células/caja); transcurrido este tiempo, se eliminó el medio y con mucho cuidado para no desprenderlas, las monocapas se lavaron 2 veces con PBS estéril.

Por otra parte, se prepararon diluciones del virus (10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10}) en medio Dulbecco sin suero. Las monocapas se infectaron con 0.2 ml/caja de cada dilución permitiendo la adsorción del virus por 60 minutos a 37°C, 10% CO₂, agitando cada 20 minutos para una mejor distribución. Pasado el tiempo de adsorción, el exceso de virus se retiró con una pipeta pasteur y se añadieron 5 ml de la mezcla agar-medio precalentando a 45°C a cada caja (ver material), dejándose solidificar a temperatura ambiente durante 45 minutos. Posteriormente, con el agar ya solidificado, las cajas se invirtieron y se incubaron a 37°C,

10% CO₂ durante 14 días. La observación de las placas se realizó mediante la tinción de las mismas con 4 ml/caja de solución de rojo neutro estéril al 0.01% (concentración final) en medio Dulbecco completo, incubando a 37°C, 10% CO₂, durante 18 horas; pasado este tiempo, el colorante fue retirado y el número de placas contado.

IV. Infección con SV40 y coinfección con Poliovirus.

La infección con SV40, se efectuó como se mencionó anteriormente sólo que ahora, tras el período de adsorción del virus, las células se incubaron 33 horas a 37°C, 10% CO₂, también con medio Dulbecco 2% suero.

Al cabo de este tiempo, el medio fue retirado y las células lavadas con PBS estéril y coinfectadas con 500 UFP/célula del virus de la Polio (título del virus 1×10^{11} UFP/célula), tomando 50 ul de solución del virus de la Polio/caja, disueltos en 0.5 ml de medio Dulbecco suero menos. Las cajas se movieron cada 20 minutos durante una hora a temperatura ambiente permitiendo así, la adsorción del virus; al cabo de este tiempo, las células se marcaron con 30 uCi/caja de ³H-timidina disueltos en medio Dulbecco 2% suero (2 ml de medio con marca/caja); las cajas se incubaron por 3 horas a 37°C, 10% CO₂.

Las células control se trataron de igual manera excepto que en ellas no se efectuó la coinfección con Polio.

V. Extracción de Minicromosomas (SV40 y SV40-POLIO) (Su y DePamphilis, 1976, modificado).

Pasado el período de coinfección, las células se lavaron 2 veces con PBS 1X y una vez con buffer H -- (ambos fríos), se agregaron después 2 ml de buffer H/caja y se esperó a que las células se hincharan manteniéndolas en observación al microscopio; cuando esto hubo sucedido, el buffer H fue retirado y las células recogidas con ayuda de un gendarme, en un volumen final de 3 ml de buffer H y colocadas en un dounce metálico de acero inoxidable en el que se les dió 5 golpes con el fin de romperlas, comprobándose esto al microscopio de contraste de fases; posteriormente se colocaron en un colchón de glicerol y se centrifugaron a 3 000 rpm durante 10 minutos a 4°C (Centrífuga Internacional PR 6 000 Rotor 269).

El sobrenadante fue retirado y la pastilla conteniendo los núcleos celulares, resuspendida en buffer H (1 ml de buffer H por cada 4 cajas de células) e incubadas de 12 a 16 horas a 0°C.

Pasando este período, las muestras se centrifugaron a 10 K, 4°C durante 40 minutos (Centrífuga Eppendorf 5414). Se recuperó el sobrenadante conteniendo los minicromosomas.

Extracción de Minicromosomas (Varshavsky, 1978)

Luego de la infección con SV40, coinfección con Polio-virus y marcaje con el precursor radiactivo ^3H -Timidina a las monocapas de células CV-1, éstas se lavaron dos veces con solución I, (2.5 ml por caja), la primera rápidamente y la segunda dejando las cajas inclinadas un momento, todo esto y los siguientes pasos se realizaron en hielo. Se agregaron después, 2 ml "exactos" de solución II a cada caja y 60 μl de NaCl 4 M poco a poco, con la caja inclinada, agitándola con la mano suavemente; se incubaron a 4°C por 10 minutos. El lisado obtenido se raspó suavemente con un gendarme, recogiendo y centrifugando a 6500 rpm en un rotor JA 20 a 4°C por 5 minutos; la pastilla obtenida se resuspendió en solución III (10 ml/5 cajas) y se centrifugaron a 6500 rpm por 5 minutos. La pastilla nuclear se resuspendió en 400 μl de solución IV por goteo y luego por golpecitos con la mano; la suspensión se agitó suavemente por 3 horas a 4°C; posteriormente se centrifugó a 6500 rpm por 15 minutos en un rotor JA 20, centrífuga Beckman; se recuperó el sobrenadante conteniendo los minicromosomas.

De la cantidad total de minicromosomas obtenidos mediante el método de buffer H, se hizo un cálculo proporcional de las cantidades requeridas de los mismos para las diferentes pruebas que se deseaban realizar.

Así, se tomó el 50% para su purificación en gradientes de sacarosa (5-20%); el 50% restante se dividió tomando 10% para determinar la concentración de minicromosomas mediante su tinción en geles de agarosa, y el resto para el análisis de restricción.

Los minicromosomas obtenidos por el método de Varshavsky se purificaron en gradientes de sacarosa (5-20%) y, directamente del gradiente se tomaron para los ensayos de restricción y cuantificación por electroforesis en geles de agarosa.

VI Concentración de Minicromosomas.

Las muestras de minicromosomas obtenidos de la manera antes mencionada (buffer H), fueron sometidos a un proceso de desproteínización y precipitación de ácidos nucleicos mediante la adición de TCA-Na-EtOH y su centrifugación a 4°C durante 20 minutos a -- 15 000 rpm (Centrífuga Eppendorf 5414).

Una vez finalizado el paso anterior, las muestras fueron decantadas y las pastillas lavadas con Et-OH al 80%, sin resuspenderlas y centrifugando 10 minutos a 4°C para un mejor empastillamiento. Posteriormente, las pastillas se dejaron secar aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente para luego resuspenderlas en 30 ul de agua cada una; como último paso, las muestras se corrieron en un gel de agarosa, calculándose de manera cualitativa la concentración de ADN.

Por otro, se tomaron alicuotas iguales de cada una de las muestras de minicromosomas y se colocaron en papel whatman 3 MM dejandoseles secar para, posteriormente, lavarlos 5 veces con TCA al 5% frío y 2 veces con etanol absoluto, finalizado este procedimiento los papeles fueron puestos a secar y, luego se colocaron en la mezcla Tolueno-Tritón I y se cuantificaron las cuentas por minuto (cpm) de cada uno en el contador de centelleo líquido (Minaxi B Tri-Carb 4000 Series, Packard).

Purificación en gradiente de sacarosa

Se uso un gradiente de sacarosa del 5 al 20% en el que se colocó la solución de M-SV40, y otro

gradiente en las mismas condiciones para colocar la solución de M-SV40-POLIO, ambas soluciones se centrifugaron en un rotor SW50.1 durante 60 minutos a 40 000 rpm a 4°C; posteriormente, se colectaron fracciones de 200 ul cada una y se determinó la cantidad de material radiactivo que contenían en un contador de centelleo líquido.

VII Análisis de restricción.

Una vez obtenidos los minicromosomas, muestras separadas y cantidades semejantes de cada uno fueron incubados con diferentes enzimas de restricción durante una hora a 37°C. Como paso siguiente, se procedió a realizar la desproteínización y precipitación de ácidos nucleicos de las muestras con TCA-Na-OH y su corrimiento en gel de agarosa, posteriormente, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y desteñidos con agua para luego fotografiarlos con película royal Pan cromática (Kodak) a través de un transiluminador (UVP,INC).

Después, los geles se fijaron con metanol y PPO (Laskey y cols., 1975) y se secaron con calor y vacío tras lo cual fueron colocados en una placa para fluorografía X-Omat (Kodak) y puestas a -70°C por 8-12 días para luego revelarlas.

RESULTADOS

Purificación y Titulación de Viriones de SV40.

Con el fin de obtener una buena cantidad de virus SV40, células CV-1 fueron infectadas con éste a una multiplicidad de infección de 10 UFP/célula que conduce a una infección productiva. Después de 7-9 días, la monocapa de células fue recuperada junto con el medio de cultivo presente durante la infección, los virus intra y extracelulares fueron colectados mediante centrifugación a alta velocidad, la pastilla resultante de procesó como se indica en la Metodología (Brady y cols., 1980, modificado) con el fin de purificar los viriones, al final de dicha purificación se obtuvieron dos tipos de partículas (figura 3). La primera de ellas (banda I) con una densidad de 1.32 g/ml en cantidad discreta y otra más notable (banda II) con una densidad de 1.29 g/ml.

Las bandas descritas anteriormente se colectaron mediante punción del tubo de centrífuga reuniéndolas y determinando su capacidad infectiva (virus íntegros mediante titulación por unidades formadoras de placa (UFP) (ver metodología), el resultado de este proceso nos dió un título de 6×10^9 UFP/ml.

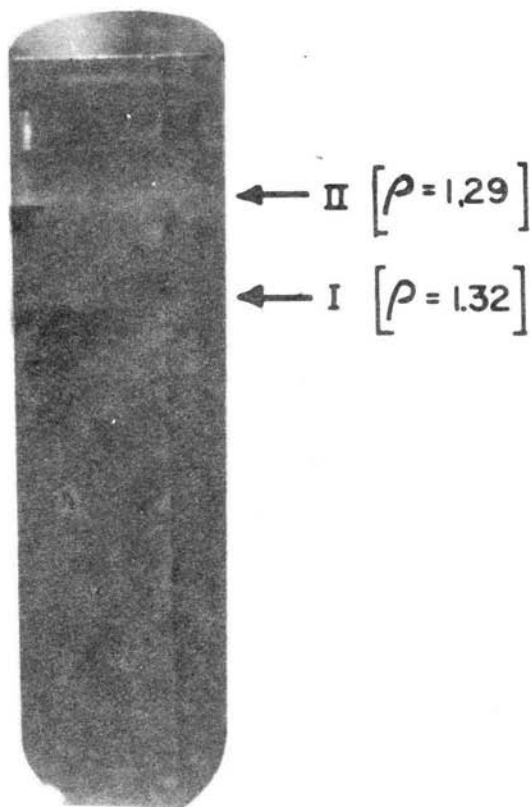


Figura 3

Purificación de viriones por el método de Brady y cols. (1980), modificado. Se obtuvieron dos bandas cuyas densidades se muestran e indican dos tipos de partículas de las cuales se determinó su capacidad infectiva mediante la técnica de UFP.

Infección con SV40 y coinfección con Poliovirus

Las células CV-1 derivadas de riñón de mono, permisivas a SV40 y a poliovirus, fueron infectadas con el primero y tras 33 horas de infección superinfectadas con el segundo, como se describe en la Metodología; para estos procesos se empleó un total de 6×10^7 células con el fin de obtener una población suficiente de minicromosomas de SV40 para ser analizados.

Extracción de DNA, su análisis en gradiente de sacarosa y ensayo de restricción.

Los minicromosomas de SV40 analizados fueron obtenidos mediante dos métodos diferentes, el primero a través de un buffer hipotónico nos proporcionó una cantidad considerable del material que, comparada con la obtenida por el segundo método, el cual emplea un buffer isotónico, fue menor probablemente debido al uso del detergente aniónico (tritón X-100) y a la concentración de sal del segundo.

Así, los minicromosomas obtenidos se purificaron en un gradiente de sacarosa (5-20%). La figura 4 muestra las gráficas conseguidas al analizar las fracciones del gradiente. En dicha figura se aprecia

un pico máximo para los minicromosomas obtenidos mediante el método de buffer H (hipotónico), localizado en las fracciones 13 y 14 del gradiente, (figura 4, partes A y B), mientras que, para los minicromosomas obtenidos por el método de buffer isotónico y detergente aniónico este pico se observa en las fracciones 9-13, probablemente por un ligero desfaseamiento del gradiente (para el caso de M-SV40-POLIO) ya que cuantificando el material total observado se apreciaba una igualdad entre M-SV40 y M-SV40-POLIO (figura 4, partes C M-SV40, y D M-SV40-POLIO).

Concentración de minicromosomas. El cálculo de la concentración de minicromosomas obtenidos se llevo a cabo conforme se describió en la Metodología; la figura 5 muestra el resultado de este cálculo, tal figura muestra diferentes cantidades de M-SV40 y M-SV40-POLIO, apreciándose, de manera cualitativa las concentraciones de dichas muestras.

El ensayo de restricción se realizó empleando las enzimas Bgl I, Eco RI y Pst I, cuyos sitios de corte se localizan en los puntos 0 y 1782 para las dos primeras, respectivamente y en 1988 y 3224 para Pst I (ver figura 6).

El patrón de restricción obtenido tanto para M-SV40 como para M-SV40-POLIO, con los dos métodos

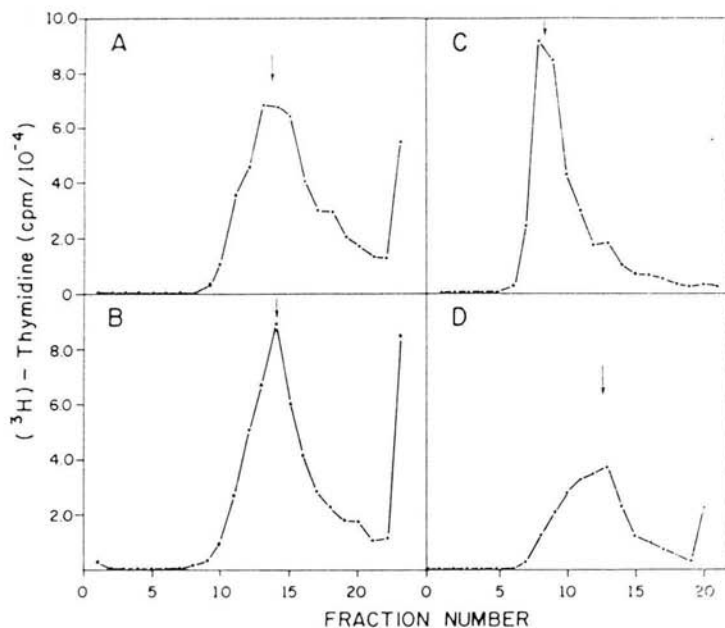
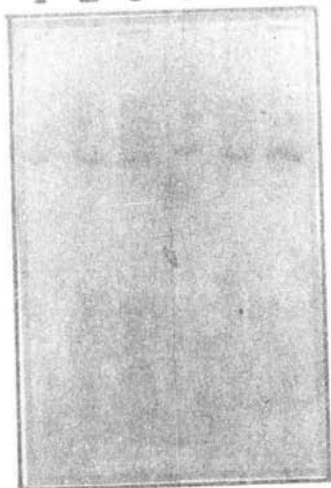


Figura 4

Minicromosomas de SV40 obtenidos por dos métodos de extracción: buffer H (hipotónico) partes A y B y buffer isotónico y detergente, partes C y D. A y C muestran a M-SV40 y B y D a M-SV40-POLIO. Tras la extracción, los minicromosomas se analizaron en un gradiente de sacarosa 5-20%, las flechas indican la localización de los minicromosomas dentro del gradiente.

1 2 3 5 6 7

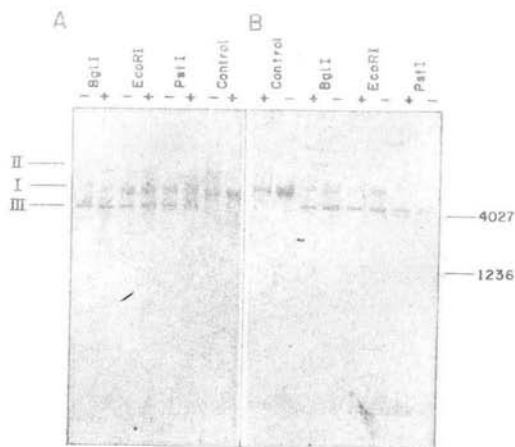


52

- 1 - SV40 (5 μ l)
- 2 - SV40 (10 μ l)
- 3 - SV40 (15 μ l)
- 5 - SV40-Polio (5 μ l)
- 6 - SV40-Polio (10 μ l)
- 7 - SV40-Polio (15 μ l)

Figura 5

Cálculo cualitativo de la concentración de mini-cromosomas mediante el análisis de diferentes cantidades de ellos en un gel de agarosa al 1% y su tinción con bromuro de etidio.



53

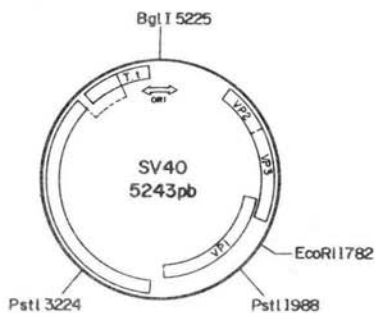


Figura 6

Patrón de restricción de M-SV40 (-) y M-SV40-POLIO (+), luego de su incubación con las enzimas de restricción Bgl I, Eco RI y Pst I. La parte A de la figura muestra los minicromosomas obtenidos por el método de buffer H y la B los extraídos por buffer isotónico y detergente. I, II y III indican las formas de DNA observados que corresponden a la superenrollada, circular relajada y lineal, respectivamente.

La parte inferior muestra el mapa genómico de SV40 indicando los sitios de corte de cada una de las enzimas empleadas.

de extracción, se muestra en la figura 6; en la parte A de esta figura se observan los minicromosomas extraídos con el método h (hipotónico) y, en la parte B los extraídos con el amortiguador isotónico. Así mismo, se pueden apreciar las formas de DNA reportados, es decir, la forma superenrollada, la circular relajada y la lineal, así como el genoma de SV40 donde se muestran los sitios de corte de las enzimas empleadas.

La cantidad de DNA linearizados con las diferentes enzimas es muy parecido en ambos casos, lo cual sugiere una semejanza total entre los dos templados, esto es, M-SV40 y M-SV40-POLIO.

Es de hacer notar que detectamos un ligero incremento en el corte con la enzima Bgl I, corroborando los resultados obtenidos por otros investigadores (Weiss y cols., 1986); este incremento es similar tanto para M-SV40 como para M-SV40-POLIO.

La figura 7 muestra una cinética de restricción para M-SV40 y M-SV40-POLIO con la enzima Bgl I, la cual, se realizó a los tiempos 0, 15, 30 y 60 minutos de incubación a 32°C, con el fin de observar si el corte con esta enzima en ambos minicromosomas estaba determinado por la concentración de los mismos o por el tiempo de incubación con la enzima. A 0 minutos se observa un leve corte en el material incubado mismo

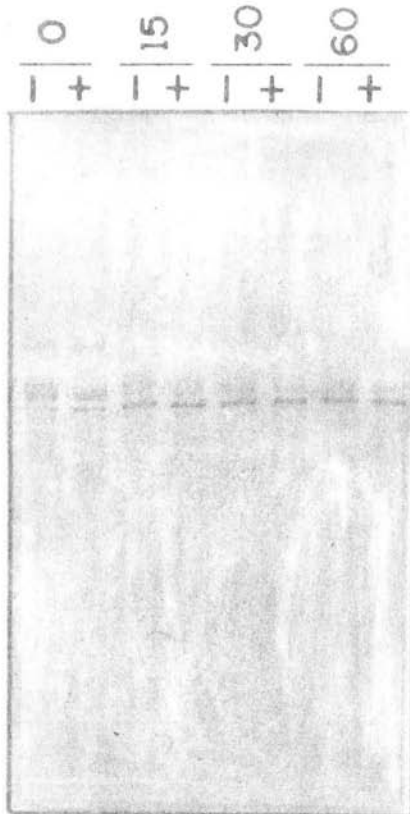


Figura 7

Cinética de restricción con la enzima Bgl I para M-SV40 (-) y M-SV40-POLIO (+) a diferentes tiempos de incubación a 32°C.

que fue totalmente linearizado a partir de los 15 minutos de incubación con la enzima, este resultado fue observado para nuestras muestras de control y problema sin ninguna diferencia significativa entre ellas.

Con el fin de tener una mejor apreciación de nuestros resultados, los geles fueron tratados con el método de Laskey y cols. (1975) para obtener de ellos una fluorografía (figuras 8 y 9). Estas fluorografías se consiguieron tras 8-12 días de exposición y en ellas se muestran los minicromosomas (M-SV40 y M-SV40-POLIO) en sus formas superenrollada, circular relajada y lineal obtenidos tras la incubación de los mismos con las enzimas Bgl I, Eco RI y Pst I, así como nuestras muestras control.

La diferencia en cantidad de marca observada para la parte B con respecto a la A en esta figura, se debe a una mayor exposición de esa placa y a la mayor cantidad de material radiactivo para la misma.

La figura 10 muestra el porcentaje de moléculas de DNA de M-SV40 y M-SV40-POLIO restringidas con las enzimas Bgl I, EcoRI y Pst I, observando un incremento en la sensibilidad a Bgl I con ambos métodos de extracción. Para Pst I se observa un aumento en la cantidad de DNA restringido utilizando el buffer isotónico.

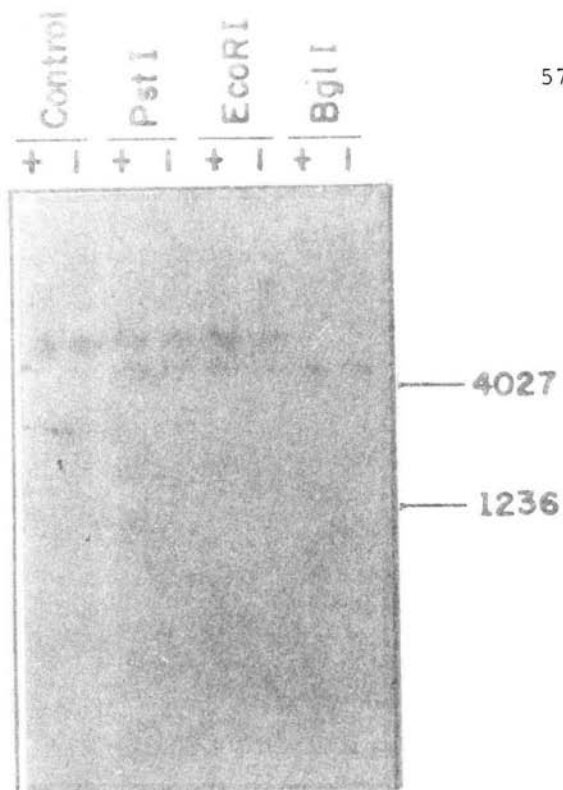


Figura 8

Fluorografía del gel con el patrón de restricción de M-SV40 (-) y M-SV40-POLIO (+) obtenido por el método de buffer H. El gel fue tratado con el método de Laskey y cols. (1975) y se expuso durante 8 días en una placa X-Omat a -72°C . Se indica el tamaño de los fragmentos obtenidos con la enzima Pst I.

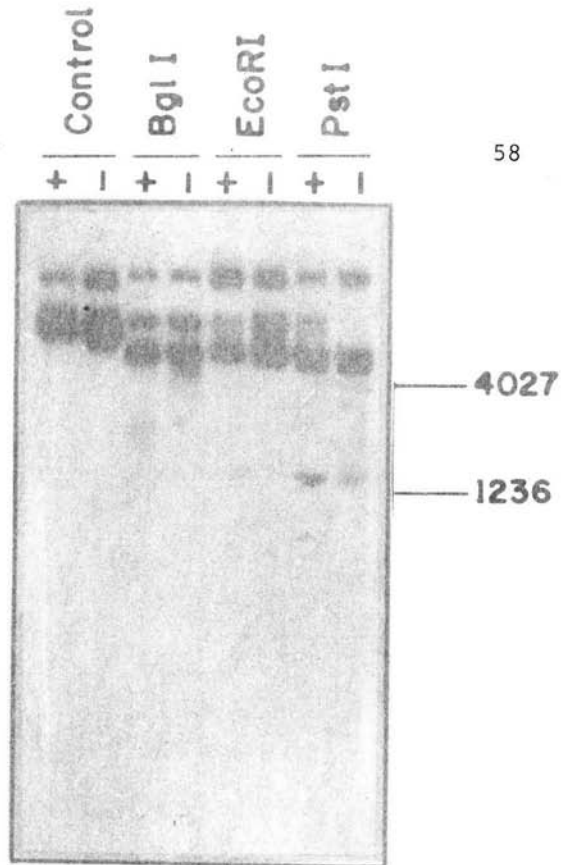


Figura 9

Fluorografía del gel con el patrón de restricción de M-SV40 (-) y M-SV40-POLIO (+) obtenido por el método de buffer isotónico y detergente. El gel se trató con el método de Laskey y cols. (1975) y se expuso durante 12 días en una placa X-Omat a -72°C . Se indica el tamaño de los fragmentos obtenidos con la enzima Pst I.

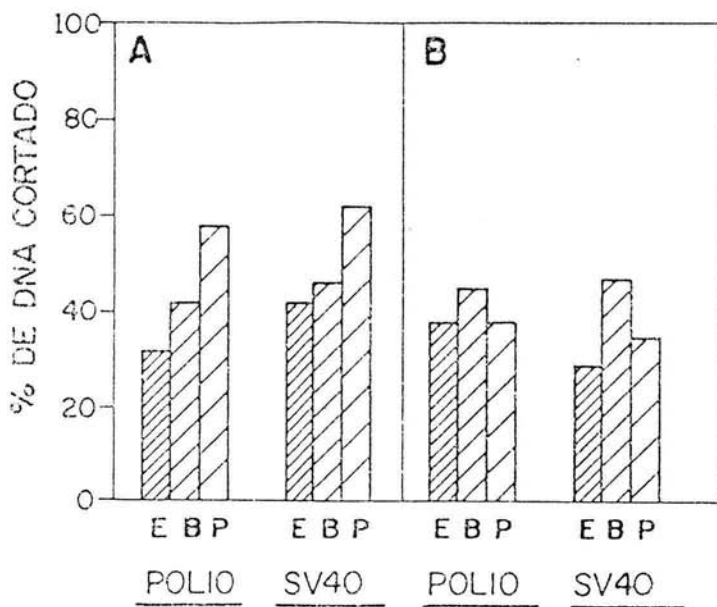


Figura 10.

Porcentaje de DNA restringido con las enzimas - Bgl I, EcoRI y PstI obtenido por análisis densitométrico. A y B, micromosomas extraídas con buffer isotónico e hipotónico, respectivamente.

DISCUSION

Durante la infección con el virus de la poliomielitis a células de mamífero hay una marcada inhibición en la síntesis de macromoléculas siendo esta inhibición severa en la síntesis de proteínas y drástica en la de RNA. En lo que se refiere a la inhibición de la transcripción, se sabe que ocurre en el inicio del proceso, y sobre el mecanismo se sugiere que es la ausencia de un factor celular necesario para el inicio específico de la transcripción lo que causa tal inhibición (Crawford, 1981; Lazard y cols., 1989); también se ha sugerido que alguna proteína viral actúe como inhibidor en el proceso transcripcional (Ho y Washington, 1971; Bienz y cols., 1982; Balandin y cols. 1964).

Estas evidencias pueden formar un mismo mecanismo, es decir, el factor celular puede ser el blanco del inhibidor viral y, se ha sugerido que tal vez este blanco sea la misma RNA polimerasa II ya que se ha encontrado, al analizar la población de RNA polimerasa que la subunidad IIO de la enzima se encuentra alterada (Rangel y cols., 1987, 1988).

Holland y Peterson (1964), por otro lado, han reportado que el templado usado por la RNA polimerasa no está modificado, no contemplando, sin embargo,

la posible alteración de la estructura conformacional de la cromatina celular que, de existir, tal vez podría estar interviniendo en la transcripción normal de la célula.

Para abordar esta posibilidad, en el presente trabajo se empleó el virus SV40 como sistema análogo de cromatina celular (M-SV40-POL10) para estudiar las alteraciones estructurales que éste pudiera tener sobre ella.

Reportes anteriores sobre las características constitutivas del minicromosoma de SV40 en los que se muestran nucleosomas interconectados por filamentos de DNA desnudo que conforman las moléculas circulares relajadas. (Cremisi y cols., 1976; Choder y Aloni, 1988). Ensayos de restricción de estas moléculas con Eco R1 muestran que hay una sensibilidad parcial de estos complejos para ser digeridos con la enzima lo cual sugiere que los nucleosomas no se forman en sitios específicos del genoma viral (Cremisi y cols., 1976).

Weiss y cols. (1987), en un análisis de la estructura de la cromatina de SV40 a través de la accesibilidad que enzimas de restricción pudieran tener sobre ella, han encontrado que la región tardía del minicromosoma de SV40 transcripcionalmente activo, es más accesible al corte que la región temprana.

En otro reporte sobre la estructura conformacional del minicromosoma de SV40, Choder y Aloni (1988), han analizado la topología de minicromosomas transcritos y no transcritos de fracciones de minicromosomas transcripcionalmente activos (1%); como se sabe, aquellos minicromosomas que son transcripcionalmente activos poseen la región ORI o gap libre de nucleosomas, hipersensible a la endonucleasa Bgl I (Weiss y cols., 1986). El trabajo realizado por Choder y Aloni mostró que, tanto el DNA transcrito como el no transcrito están de igual manera superenrollados o compactados por nucleosomas. Esto podría explicar tal vez, el hecho de que a pesar de ser una cantidad muy pequeña la de minicromosomas transcripcionalmente activos (1%) se tenga una gran cantidad (aproximadamente un 30% de material restringido con la enzima Bgl I (Llopis y cols., 1981). Así mismo, estos autores han analizado específicamente la topología de la región gap de SV40 observando que esa zona presenta un enrollamiento espontáneo que la coloca dentro de lo que se puede llamar una región de DNA extrasuperenrollado; la localización de este superenrollamiento puede depender de al menos dos uniones específicas del minicromosoma a la matriz nuclear.

En nuestro trabajo, los minicromosomas

de SV40 se extrajeron por dos métodos diferentes; el primero (Su y DePamphilis, 1976, modificado) consistió en el uso de un buffer hipotónico (buffer H) y el segundo (Varshavsky, 1978) en el de un buffer isotónico con detergente (tritón X-100).

Teniendo como sistema control al M-SV40 y como problema al M-SV40-POLIO, se realizaron ensayos con enzimas de restricción con el fin de determinar la accesibilidad que éstas pudieran tener sobre ambos minicromosomas.

Los resultados de ambos métodos de extracción no muestran diferencias significativas pues se observa igual cantidad de DNA cortado tanto para M-SV40, como para M-SV40-POLIO, para cada una de las enzimas empleadas. De este modo se observa que, tras la incubación con las enzimas de restricción, se obtienen tres poblaciones de DNA dentro de la muestra examinada que corresponden a las formas superenrollada, circular relajada y lineal (I, II y III, respectivamente). (Weiss y cols., 1987; Weiss y cols., 1986).

Comparando las cantidades de DNA linealizado con las tres enzimas empleadas, notamos un ligero aumento en el corte con ^HBgl I, empleando el buffer H, lo cual comprueba el reporte de Weiss y cols. (1986), así mismo, notamos que este incremento en el corte fue semejante para M-SV40 y M-SV40-POLIO. Por otro lado, empleando el buffer isotónico observamos además de este incremen-

to con Bgl 1, un aumento en el porcentaje de moléculas restringidas con Pst 1 para ambos minicromosomas.

De igual manera, el encontrar que la cantidad del DNA cortado fue, aproximadamente la misma para las tres enzimas empleadas apoya más la sugerencia de Cre mis i y cols. (1976) de que los nucleosomas no se forman en sitios específicos del genoma viral, ya que no se bloquea de manera directa ninguno de los puntos o sitios de restricción de las enzimas empleadas, sino que se obtiene un patrón muy similar entre unas y otras y entre los mismos M-SV40 y M-SV40-POLIO. Nuestros datos son consistentes también con la hipótesis de Choder y Aloni (1988) sobre la igual compactación o superenrollamiento de los minicromosomas activos y no activos transcripcionalmente.

Por otro lado, la confirmación de los resultados de Weiss y cols., (1988) a través de los nuestros para el caso de M-SV40 y la comparación de tales resultados con los obtenidos para M-SV40-POLIO sugiere que poliovirus no está ejerciendo un efecto determinante sobre el DNA de SV40 a nivel de su estructura conformacional y que el efecto real que causa sea el propuesto por Crawford y cols. (1981), Lazard y cols. (1989) y Rangel y cols. (1987, 1988) es decir, la ausencia de un factor celular necesario para el inicio de la transcripción.

C O N C L U S I O N E S

1. No se encontraron diferencias significativas en el patrón de restricción de M-SV40 y M-SV40-POLIO obtenidos por dos métodos distintos (buffer H y buffer isotónico y detergente).

2. Se observó un ligero incremento en la cantidad de DNA restringido con la enzima Bgl I, tanto para M-SV40 como para M-SV40-POLIO, respecto a las demás enzimas empleadas, corroborando resultados anteriores (Weiss y cols. 1986).

3. El patrón de restricción obtenido con las 3 enzimas empleadas apoya la idea de que los nucleosomas no se forman en sitios específicos del genoma viral.

4. Por último, nuestros resultados, sugieren que poliovirus no está ejerciendo un efecto determinante a nivel de estructura conformacional del DNA de SV40.

B I B L I O G R A F I A

- Alonso, M. A. and Carrasco, L. 1981 Revision by hipotonic medium of the shutoff of protein synthesis induced by Encefalomyocarditis virus. *J. Virol.* 37:535-540.
- Apriletti, J. W. and Penhoet, E. E. 1974. Recovery of DNA-dependent RNA polymerase activities from L cells after Mengovirus infection. *Virol.* 61:597-601.
- Bablanian, R. 1972 Depression of macromolecular synthesis in cells infected with guanidine-dependent Poliovirus under restrictive conditions. *Virol.* 47:255-259.
- Balandin, G. I. and Franklin, M. P. 1964. The effect of Mengovirus infection on the activity of the DNA-dependent RNA polymerase of L cells. *Biochem. Biophys. Research Communi.* 15:27-32.
- Baltimore, D., Franklin, M.P. and Callender, J. 1963. Mengovirus induced inhibition of host ribonucleic acid an protein synthesis. *Biochem. Biophys. Acta* 76:425-430.
- Beard, P. and Nyfeler, K. 1982. Transcription of SV40 chromosomes in an extract of HeLa cells. *J. Virol.* 1:9-14.
- Bienz, K., Egger, D., Rasser, Y and Bossart, . 1982. - - Accumulation of Poliovirus proteins in the host cell nucleus. *Intervirol.* 18:189-196.

- Bienz, K., Egger, D., Rasser, Y. and Loeffler, H. 1978. Differential inhibition of host cell RNA synthesis in several Picornavirus infected cell lines. *Intervirology*. 10:209-220
- Borowiec, J. A. and Hurwitz, J. 1988. Localized melting and structural change in the SV40 origin of replication induced by T-antigen *EMBO J.* 7(10):3149-3158.
- Bossart, W., Egger, D., Rasser, Y. and Bienz, K. 1984. Accumulation of Poliovirus proteins in uninfected isolated Hep-2 cell nuclei in vitro. *Intervirology*. 21:150-158.
- Brady, J.N., Winston, V.D. and Consigli, R.A. 1977. Dissociation of Polyoma virus by the chelation of calcium ions found associated with purified virions. *J. Virol.* 23:717-724.
- Colby, S.D., Finnerty, V. and Lenard-Lucas, J. 1974. Fate of mRNA of L cells infected with Mengovirus. *J. Virol.* 13:858-869.
- Contreras, G., Summers, D.F., Maizel, J.V. and Ehrenfeld E. 1973. HeLa cell nucleolar RNA synthesis after Poliovirus infection. *Virol.* 53:120-129.

- Contreras, A. and Carrasco, L. 1981. Selective inhibition of protein synthesis in virus-infected mammalian cells. *J.Virol.* 29:114-122.
- Crawford, N., Fire, A., Samuels, M., Sharp, A.P. and Baltimore, D. 1981. Inhibition of transcription factor activity by Poliovirus. *Cell.* 27:551-561.
- Crembsi, Ch., Pignatti, P.F., Croissant, O. and Yaniv, M. 1976. Chromatin-like structures in Polyoma virus and Simian Virus 40 lytic cycle. *J. Virol.* 17(1):204-211.
- Choder, M. and Aloni, Y. 1988. In vitro transcribed SV40 minichromosomes, as the bulk minichromosomes, have a low level of unconstrained negative supercoils. *Nuclei. Acid. Res.* 16(3):895-905.
- Darnell, J.E., Girard, M., Baltimore, D. and Maizel, J.V. 1967. The molecular biology of viruses. Eds. Colter, J.S. and Paramchych, W. Acad. Press, New York. PP 375.
- Davison, B.L., Egly, J.M., Mulvihill, E.R. and Chambon, P. 1983. Formation of stable preinitiation complexes between eukaryotic class B transcription factors and promotor sequences. *Nature.* 304:680-686.

- Del Angel, R.M., Papavassiliou, A.G., Fernández-Tomás, C., Silverstein, S.J. and Racaniello, V. 1989. Cell proteins bind to multiple sites within the 5'-untranslated region of Poliovirus RNA. Enviado.
- Díaz-Moreno, A. 1983. Tesis de Maestría. Depto. Biología Celular. CINVESTAV-IPN, México.
- Djnan, W.S. and Tjian, R. 1985. Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA binding proteins. Nature. 316:774-778.
- Ehrenfeld, E. 1982. Poliovirus-induced inhibition of host cell protein synthesis. Cell. 28:435-436.
- Ehrenfeld, E. and Lloyd, R.E. 1985. Purification of the Poliovirus-induced cap recognition inactivator. Fourth Meeting of the European group of Molecular Biology of Picornaviruses.
- Ehrenfeld, E. and Manis, S. 1979. Inhibition of 80S initiation complex formation by infection with Poliovirus. J. Gen. Virol. 43:441-445.
- Etchison, D., Milburn, S.C., Edery, I., Sonenberg, N. and Hershey, J.W.B. 1982. Inhibition of HeLa cells protein synthesis following Poliovirus infection

- correlates with proteolysis of a 220,000-dalton polypeptide associated with eukaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. *J. Biol. Chem.* 25(24):14806-14810.
- Fenner, F., White, D.D. 1972. *Medical Virology*. Academic Press. New York. PP 269-277.
- Fernández-Muñoz, R. 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.* 18:719-726.
- Fernández-Muñoz, R., Coca-Prados, M. and Hsu, M.T. 1979. Intracellular forms of Simian Virus 40 nucleoprotein complexes. I. Methods of isolation and characterization in CV-1 cells. *J. Virol.* 29(2):612-623.
- Fernández-Tomás, C. 1987. Virus-directed suppression of host transcription. *Mechanisms of Viral Toxicity in Animal Cells*. CRC Press. PP 21-58.
- Fernández-Tomás, C. 1982 The presence of viral-induced proteins in nuclei from Poliovirus-infected HeLa cells. *Virol.* 116:629-634.

- Flanagan, J. B., Pettersson, R. F., Ambros, V., Hewlett, M. J. and Baltimore, D. 1977. Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNAs of Poliovirus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74 (3):961-965.

- Flores-Otero, G., Fernández-Tomás, C. and Gariglio, P. 1982. DNA bound RNA polymerases during Poliovirus infection; reduction in the number of from II enzyme molecules. Virol. 116:619-628.

- Fradkin, G. L., Yoshinaga, S. K., Berk, A. J. and Drasgrupta, A. 1987. Inhibition of host cell RNA polymerase III-mediated transcription by Poliovirus: Inactivation of specific transcription factors. Mol. Cell. Biol. 7:3880-3887.

- Franklin, R. M. and Baltimore, D. 1962. Patterns of macromolecular synthesis in normal and virus-infected mammalian cells. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 27:175-198.

- Girard, M. 1969. In vitro synthesis of Poliovirus Ribonucleic Acid; role of the replicative intermediate J. Virol. 3(4):376-384.

- Grass, D. S., Jove, R. and Manley, J. L. 1987. RNA polymerase II terminates transcription in vitro in the SV40 origin region. *Nuc. Ac. Res.* 15(11):4417-4437.
- Handa, H., Kaufman, R. J., Manley, J., Gefter, M. and Sharo, P. A. 1980. Transcription of Simian Virus 40 DNA in ha HeLa whole cell extract. *J. Biol. Chem.* 256:
- Hanecack, R. Semler, B. L., Ariga H., Anderson, C.W. and Wimmer, E. 1984. Expression of a cloned gen segment of Poliovirus in E. coli: evidence for autocatalytic production of the viral proteinasa. *Cell* 37:1063-1073.
- Ho, K. P. P. and Washington, L. A. 1971. Evidence for a cellular Ribonuclei Acid synthesis inhibitor from Poliovirus-infected HeLa cells. *Biochem.* 10: 3646-3651.
- Holland, J.J. 1964. Inhibition of host cell macromolecular synthesis by high multiplicities of Poliovirus under conditions preventing virus syntesis. *J. Mol. Biol.* 8: 574-581.
- Holland, J.J. and Peterson, J. A. 1964. Nucleic acid and protein synthesis during Poliovirus infection of human cells. *J. Mol. Biol.* 8:556-573.

- Jore, J., De Geus, B., Jackson, R. J., Pouwels, P. and Enger-Volk, B. E. 1988. Poliovirus protein 3CD is the active protease for processing of the precursor protein P1 in vitro. *J. Gen. Virol.* 69:1627-1636.
- Kaufmann, Y., Goldstein, E. and Penman, S. 1976. Poliovirus induced inhibition of polypeptide initiation in vitro on native polyribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:1834.
- Laskey, R.A. and Mells, A.D. 1975. Quantitative film detection of ^3H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur J. Biochem.* 56:333-341.
- Lazard, D., Fernández-Tomás, C., Gariglio, P. and Weinmann, R. 1989. Modification of an Adenovirus major late promoter binding factor during Poliovirus infection. Enviado.
- Leibowitz, R. and Penman, S. 1971. Regulation of protein synthesis in HeLa cells. *J. Virol.* 8:661-668.
- Lehninger, A.L. 1982. *Bioquímica*. Ed. Omega, Barcelona. 2a. ed. PP 947, 955, 956.
- Llopis, R., Perrin, F., Bellard, F. and Gariglio, P. 1981. Quantitation of transcribing native Simian Virus 40 minichromosomes extracted from CV-1 cells late in infection. *J. Virol.* 38(1):82-90.

- Nicklin, M. J. H., Toyoda, H., Murray, M. G. and Wimmer, E. 1986. Proteolytic processing in the replication of Polio and related viruses. *Bio/tec.* 4:33-42.
- Núñez, V. M. E. 1985. Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala. UNAM. México.
- Manley, J. L., Fire, A., Cano, A., Sharp, P. A. and Cifter, L. M. 1980. DNA dependent transcription of Adenovirus genes in a soluble whole-cell extract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:3855-3859.
- Martin, E. M., Malec, J., Sved, S. and Work, T. S. 1961. Studies on protein and nucleic acid metabolism in virus-infected mammalian cells. *Biochem. J.* 80:585-597.
- McCormick, W. and Penman, S. 1967. Inhibition of RNA synthesis in HeLa and L cells by Mengovirus. *Virology.* 31:135-141.
- Miller, H. Z., Penhoet, E. E. 1972. Differential inhibition of nuclear RNA polymerase in L cells infected with Mengovirus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 140:435-438.

- Pallansch, M. A., Kew, O. M., Semler, B.L., Omilianowski, D. R., Anderson, C. W., Wimmer, E. and Rueckert, R. R. 1984. Protein processing map of Poliovirus. *J. Virol.* 49(3):873-880.
- Penman, S., Scherren, K., Becker, Y. and Bernell, J. E. 1963. Polyribosomes in normal and Poliovirus infected HeLa cells and their relationship to mRNA. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA.* 49:654-662.
- Penman, S. and Summers, D. 1963. Effects on host cell metabolism following synchronous infection with Poliovirus. *Virol.* 27:614-620.
- Rangel, L. M., Fernández-Tomás, C., Dahmus, M. and Gariglio P. 1987. Modification of RNA polymerase II0 subspecies after Poliovirus infection. *J. Virol.* 61:1002-1006.
- Rangel, L.M., Fernández-Tomás, C., Dahmus, M. E. and Gariglio, P. 1988. Poliovirus-induced modification of host cell RNA polymerase II0 is prevented by cycloheximide and zinc. *J. Biol. Chem.* 263(36):19267-19269.

- Robbins, P.D., Río, D.C. and Botchan, M.R. 1986. Trans-Activation of the Simian Virus 40 enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 6(4):1283-1295.
- Rose, J. K., Trachsel, M., Leong, K. and Baltimore, D. 1978 Inhibition of translation by Poliovirus: Inactivation of a specific initiation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:2732-2736.
- Salzman, N. P., Kockart, R. Z. and Serring, E. D. 1959. Alterations in HeLa cell metabolism resulting from Poliovirus infection. *Virol.* 9:244-259.
- Sánchez, T.A. 1983. Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala UNAM. México.
- Sassone-Corsi, P., Wildeman, A. and Chambon, P. 1985. A trans-acting factor is responsible for the Simian Virus 40 enhancer activity in vitro. *Nature.* 313: 458-463.
- Schwartz, L. B., Lawrence, C., Tach, R. E. and Roeder, R. G. 1974. Encephalomyocarditis virus infection of mouse plasmacytoma cells II. Effect on host RNA synthesis and RNA polymerases. *J. Virol.* 14:611-619.

- Semler, B. L., Anderson, C. W., Kitamura, N., Rothberg, P. G. Wishart, W. L. and Wimmer, E. 1981. Poliovirus replication proteins: RNA sequence encoding P3-lb and the sites of proteolytic processing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78(6):3464-3468.

- Semler, B. L., Hanecak, R., Dorner, L. F., Anderson, W. C. and Wimmer, E. 1983. Poliovirus RNA synthesis in vitro: structural elements and antibody inhibition. Virol. 126:624-635.

- Sonenberg, N. 1987. Regulation of translation by Poliovirus. Advances In Virus Research. 33:175-404.

- Su, R.T. and DePamphilis, M. L. 1976. In vitro replication of Simian Virus 40 DNA in a nucleoprotein complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73(10):3466-3470.

- Tack, C. L. and Beard, P. 1985. Both trans-acting factors and chromatin structure are involved in the regulation of transcription from the early and late promoters in Simian Virus 40 chromosomes. J. Virol. 54(1):207-218.

- Varshavsky, S. 1978. SV40 minichromosomes: preferential exposure of the origin of replication as probed by

- restriction endonucleases *Nuc. Ac. Res. Agos.*:3464-3477.
- Weiss, E., Dipankar, G., Schultz, P. and Oudet, P. 1985. T-antigen is the only detectable protein on the nucleosome-free origin region of isolated Simian Virus 40 minichromosomes. *Chromosoma*. 92:391-400.
 - Weiss, E. Ruhlmann, C. and Oudet, P. 1986. Transcriptionally active SV40, minichromosomes are restriction enzyme sensitive and contain a nucleosome-free origin region. *Nuc. Ac. Res.* 14(5):2045-2058.
 - Weiss, E., Regnier, E. and Oudet, P. 1987. Restriction enzyme accessibility and RNA polymerase localization on transcriptionally active SV40 minichromosomes isolated late infection. *Viol.* 159:84-93.
 - Wimmer, E. 1979. The genome-linked protein of Picornaviruses: discovery properties and possible functions. *The Molecular Biology of Picornavirus*. Pérez-Bercoff, R. Ed. Plenum, New York. PP 175-188.
 - Zimmerman, E.F., M. and Darnell, J. E. 1963. RNA synthesis in Poliovirus-infected cells. *Viol.* 19:400-408.