



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales

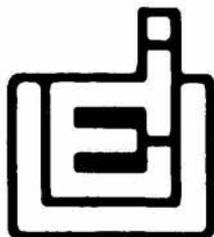
Iztacala.

IMPORTANCIA DE LA REGION NO TRADUCIDA 5' (RNT 5') EN LA
ATENUACION DEL VIRUS DE LA POLIOMIELITIS (POLIOVIRUS).

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

MARCOS CAJERO JUAREZ



Los Reyes Iztacala, México

1991

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR, DEL CENTRO DE INVESTIGACION DE ESTUDIOS AVANZADOS, EN EL LABORATORIO DE VIROLOGIA, BAJO LA DIRECCION DE LA DOCTORA ROSA MA DEL ANGEL NUÑEZ DE CACERES Y EL DOCTOR CARLOS FERNADEZ TOMAS.

A MIS PADRES:

GILBERTO Y MA DE LA LUZ.

Por su paciente apoyo y confianza.

A MIS HERMANOS.

A MIS TAN IMPORTANTES AMIGOS.

AGRADEZCO:

A LA DOCTORA ROSA MA DEL ANGEL POR SUS ENSEÑANZAS, APOYO Y
CONFIANZA.

AL DOCTOR CARLOS FERNADES TOMÁS POR SU APOYO PARA LA REALIZACION
DE ESTE TRABAJO.

INDICE.

| | |
|--|----|
| INDICE. | 1 |
| INDICE DE FIGURAS. | 6 |
| INDICE DE TABLAS. | 8 |
| RESUMEN. | 9 |
| INTRODUCCION. | 12 |
| Antecedentes generales. | 12 |
| Estructura del virus de la poliomiелitis. | 15 |
| Ciclo litico de poliovirus. | 18 |
| Replicación viral. | 18 |
| Traducción y procesamiento. | 20 |
| Efecto de la infección viral sobre la célula hospedera. | 22 |
| Inhibición de la síntesis de DNA celular. | 22 |
| Inhibición de la síntesis de RNA celular. | 22 |
| Inhibición de la síntesis de proteínas celulares. | 24 |
| Antecedentes particulares. | 29 |
| Atenuación y virulencia. | 29 |
| Región no traducida 5' (RNT 5'). | 32 |
| Estructura secundaria de la RNT 5'. | 35 |
| OBJETIVOS. | 41 |
| MATERIALES. | 42 |
| Material biológico. | 42 |
| Células. | 42 |
| Virus. | 42 |
| Bacterias. | 42 |
| Suero. | 42 |
| Medio de cultivo. | 42 |

| | |
|---|----|
| SOLUCIONES. | 42 |
| Soluciones para extracción de DNA (plásmidos). | 42 |
| Medio de cultivo bacteriano. | 42 |
| Solución para resuspender bacterias. | 42 |
| Solución para fraccionamiento celular. | 42 |
| Solución para precipitar ácidos nucléicos (PEG6000-NaCl). | 43 |
| Solución para resuspender ácidos nucleicos. | 43 |
| Solución para geles de agarosa y agarosa bajo punto de fusión. | 43 |
| Amortiguador TBE 10X. | 43 |
| Amortiguador TBE 1X. | 43 |
| Amortiguador TBE 0.5X. | 43 |
| Solución para geles nativos de poliacrilamida. | 43 |
| Soluciones para polimerisar poliacrilamida. | 44 |
| Solución agua-Dietilpirocarbonato. | 44 |
| Solución de bromuro de etidio para teñir geles de agarosa. | 44 |
| Solución para plaqueo de virus. | 44 |
| Medio DEM 2X ; suero de caballo 10% ; Antibióticos. | 44 |
| Solución para diluciones virales. | 44 |
| Solución para fijar monocapa celular. | 45 |
| Solución cristal violeta para teñir células. | 45 |
| Solución fenol saturado con tris-HCl. | 45 |
| Solución fenol-cloroformo. | 45 |
| Solución de etanol al 70%. | 45 |
| Solución para precipitar ácidos | |

| | |
|---|----|
| nucléicos (NaOAc). _____ | 45 |
| Amortiguador muestra para gel de agarosa. _____ | 45 |
| Solución para ligación de fragmentos de DNAC. _____ | 45 |
| Soluciones para células competentes. _____ | 46 |
| Medio Psi-A. _____ | 46 |
| Medio Psi-B. _____ | 46 |
| Solución TFB 1. _____ | 46 |
| Solución TFB 2. _____ | 46 |
| Solución para transformación celular. _____ | 47 |
| Medio selectivo MAC-B/ampicilina. _____ | 47 |
| Soluciones para extracto citoplásmico total. _____ | 47 |
| Solución para despegar células. _____ | 47 |
| Amortiguador RSB. _____ | 47 |
| Extracción de DNA por cloruro de cesio. _____ | 47 |
| Solución para amplificar DNA (plásmido). _____ | 47 |
| Solución para fraccionamiento celular. _____ | 47 |
| Solución EDTA. _____ | 47 |
| Solución "Tritón juice". _____ | 47 |
| Solución de bromuro de etidio. _____ | 48 |
| Solución para eliminar bromuro de etidio. _____ | 48 |
| Solución para dialisar muestras de DNA. _____ | 48 |
| Solución para lavar tubos para extracción de DNA por cloruro de cesio. _____ | 48 |
| Soluciones para transcripción "in vitro". _____ | 48 |
| Amortiguador de transcripción TB 5X. _____ | 48 |
| Solución Ditriotreitol. _____ | 48 |
| Solución de nucleótidos 5X. _____ | 48 |
| Radioisotopo para marcado de RNA. _____ | 49 |

| | |
|---|----|
| Soluciones para ensayo de retardamiento. _____ | 49 |
| Solución BB 5X. _____ | 49 |
| Solución de tRNA. _____ | 49 |
| METODOS. _____ | 50 |
| Preparación de geles de agarosa y agarosa bajo punto de fusión. _____ | 50 |
| Tinción de geles de agarosa. _____ | 50 |
| Restricción de DNA. _____ | 50 |
| Ligación de DNA (fragmento y vector). _____ | 50 |
| Extracción de fragmentos de DNA de agarosa bajo punto de fusión. _____ | 51 |
| Preparación de células competentes. _____ | 51 |
| Transformación de células competentes. _____ | 52 |
| Minipreparación de DNA. _____ | 53 |
| Extracción de DNA por gradiente de cloruro de cesio. _____ | 53 |
| Transcripción "in vitro". _____ | 55 |
| Preparación de geles nativos de poliacrilamida al 6%. _____ | 55 |
| Mezclas de reacción de retardamiento y competencia. _____ | 56 |
| Plaqueo de virus. _____ | 56 |
| Cultivo de células HeLa. _____ | 57 |
| Obtención de la RNT 5' (silvestre y mutantes). _____ | 57 |
| Clonación molecular de los segmentos de la RNT 5' 276-672 pb en el vector pGEM-4Z. _____ | 58 |
| RESULTADOS. _____ | 59 |

| | |
|--|----|
| Construcción de plásmidos recombinantes pGEM-LEON y pGEM-SABIN. _____ | 60 |
| Construcción del plásmido recombinante pGEM-SFP8. _____ | 63 |
| Análisis de restricción enzimática de los plásmidos recombinantes pGEM-LEON, pGEM-SABIN y pGEM-SFP8. _____ | 65 |
| Restricción enzimática de pGEM-LEON, pGEM-SFP8 y pGEM-SFP8 con las enzimas BamHI y Ball. _____ | 68 |
| Formación del complejo RNA-proteína (cRNP) con el RNA de la RNT 5' 276-6520 b LEON, SABIN y SFP8. _____ | 70 |
| Efecto de la concentración molar de KCl sobre la formación del complejo RNA-proteína. _____ | 70 |
| Especificidad de formación de complejo RNA-proteína. _____ | 75 |
| Construcción del plásmido recombinante pGEM-LEON222. _____ | 78 |
| Análisis de restricción enzimática del plásmido pGEM-LEON222. _____ | 80 |
| Formación ineficiente del complejo RNA-proteína con el RNA de la RNT 5' 488-620 b LEON. _____ | 82 |
| DISCUSION. _____ | 86 |
| CONCLUSIONES. _____ | 94 |
| BIBLIOGRAFIA. _____ | 99 |

INDICE DE FIGURAS.

| FIGURA No. | TITULO | PAGINA |
|---------------|---|--------|
| 1 | Patogénesis en la poliomiелitis. _____ | 14 |
| 2 | Estructura de la región terminal 5' del RNA de poliovirus. _____ | 17 |
| 3 | Perfiles electroforéticos y mapa del procesamiento de las proteínas virales, encontradas en lisados de células HeLa infectadas por poliovirus. _____ | 23 |
| 4 | Modelo para la función de eIF-4A, eIF-4B y el complejo CBP en la iniciación de la traducción. _____ | 27 |
| 5 | Predicción de la estructura secundaria de la RNT 5' de los tres serotipos de poliovirus. _____ | 37 |
| 6 | Modelo del plegamiento de la porción central (236-628 b) del RNA de la RNT 5' de la cepa LEON/37 tipo 3. _____ | 39 |
| 7 | Predicción de la estructura secundaria (1-620 b) del RNA de la RNT 5' polioviral tipo 3. _____ | 40 |
| 8 | Estrategia de construcción de los plásmidos recombinantes pGEM-LEON y pGEM-SABIN. _____ | 62 |
| 9 | Estrategia de construcción del plásmido recombinante pGEM-SFP8. _____ | 64 |
| 10 | Mapas genéticos y análisis enzimático (HindIII y BamHI), de los plásmidos pGEM-LEON, | |

| | | |
|----|---|----|
| | pGEM-SABIN y pGEM-SFP8. _____ | 66 |
| 11 | Mapas genéticos y restricción enzimática (BamHI y Bali), de los plásmidos pGEM-LEON, pGEM-SABIN y pGEM-SFP8. _____ | 69 |
| 12 | Gel de retardamiento del RNA de la RNT 5' (276-620 b) de las cepas virales LEON, SABIN y SFP8. _____ | 71 |
| 13 | Efecto de la concentración molar de sal (KCl), en la unión de proteínas celulares al RNA de la RNT 5' (276-620 b) de las cepas virales LEON, SABIN y SFP8. _____ | 72 |
| 14 | Efecto de la concentración de KCl, en la unión de proteínas celulares al RNA de la RNT 5' (276-620 b) de las cepas virales LEON, SABIN y SFP8 (276-620 b). _____ | 74 |
| 15 | Ensayo de competencia del RNA de la RNT 5' (276-620 b) de las cepas virales LEON, SABIN y SFP8. _____ | 76 |
| 16 | Estrategia de construcción del plásmido recombinante pGEM-LEON222. _____ | 79 |
| 17 | Mapas genéticos y análisis enzimático del plásmido pGEM-LEON222. _____ | 81 |
| 18 | Retardamiento y competencia de los fragmentos 488-620 y 276-620 b de la RNT 5' de la cepa viral LEON. _____ | 83 |

INDICE DE TABLAS.

| FIGURA | TITULO | PAGINA |
|--------|--|--------|
| No. | | |
| 1 | Proteínas de poliovirus. _____ | 96 |
| 2 | Propiedades de las proteasas de los Picornavirus. _____ | 97 |
| 3 | Factores de traducción de células eucarióticas. _____ | 98 |

RESUMEN.

A pesar de que el virus de la poliomielitis (poliovirus) es uno de los virus que infecta células de mamífero más estudiado, no ha sido hasta mediados de la década de los 80, que se empezó a estudiar y se ha podido determinar que la región no traducida 5' (RNT 5'), tiene participación vital en la regulación de diferentes fenómenos en dicho agente infeccioso. La RNT 5' del RNA viral (RNAv) está formada por 750 nucleótidos, donde se localizan secuencias necesarias para la traducción y replicación. Esta región presenta una estructura secundaria altamente compleja y conservada en el grupo de los Picornavirus. Se sabe que deleciones o modificaciones (mutaciones) en ciertas zonas de la RNT 5', tienen efecto sobre la eficiencia de la traducción.

La región central de la RNT 5' (250-630 b), presenta una estructura secundaria compleja, formada por "tallos y burbujas" que es reconocida internamente por ribosomas y factores protéicos celulares, lo cual puede explicar la traducción de un RNA mensajero (RNAm) que carece del residuo de 7 metil guanósina ("Cap") en el extremo 5'. En esta región también se localizan sitios cuya mutación provoca que se reduzca la neurovirulencia; así, en poliovirus tipo 3 un cambio de citosina (C) por uridina (U) en la posición 472, es determinante para que se confiera el fenotipo atenuado.

En casos de poliomielitis asociada a la administración de la cepa vacunal atenuada SABIN, se ha observado reversión al fenotipo neurovirulento, por el solo cambio de U por C en la base 472. Se ha sugerido que tales alteraciones probablemente desestabilizan la estructura secundaria de la RNT 5'.

Recientemente se ha aislado una cepa doble mutante, que ayudará a comprender, a nivel molecular, la participación de la RNT 5' en la regulación de importantes funciones virales. Esta cepa llamada SFP8, presenta como características: mutaciones en las posiciones 472 (U por C) y 482 (A por U), menor eficiencia en traducción, replicación y neurovirulencia con respecto a la cepa vacunal SABIN.

Usando ensayos de movilidad por electroforesis en gel nativo de poliacrilamida, encontramos unión específica de proteínas citoplásmicas con la secuencia comprendida entre los nucleótidos 276-620 de la RNT 5' de las cepas virales LEON (silvestre), SABIN (mutada en la base 472) y SFP8 (mutada en la base 472 y 482). Sugerimos que la estabilidad de los complejos ribonucleoprotéicos (CRNPs) que se forman con la RNT 5' de la cepa LEON, es mayor que la de los CRNPs formados con las cepas SABIN y SFP8. Esto pudo observarse dado que, a altas concentraciones de sal (150mM KCl), no se alteró el CRNP en la cepa LEON, sin embargo los CRNPs con las cepas SABIN y SFP8 fueron modificados por concentraciones de sal (100 y 150mM KCl). Por los ensayos de competencia pudimos concluir que las tres RNT 5' de las cepas virales, parecen ser reconocidas de manera específica por proteínas celulares.

Al emplear el mismo sistema de electroforesis en gel de poliacrilamida, no observamos la unión de proteínas citoplásmicas con la secuencia comprendida entre las bases 488-620, que forma parte del dominio III de la estructura secundaria de la RNT 5'; observamos leve competencia sobre la formación del CRNP, al competir la región del RNA comprendida entre 276-620 b con un

exceso de RNA competidor 488-620 b (dominio III), lo que sugiere que se necesita más de un dominio, para la eficiente formación del complejo RNA-proteína.

El conocimiento y estudio a nivel molecular de la RNT 5' viral, podría sentar las bases para la producción de nuevas vacunas atenuadas incapaces de revertir a la neurovirulencia, así, como también para el conocimiento de los mecanismos alternos de regulación de otros genes virales y celulares.

Recientemente están apareciendo reportes sobre genes que presentan RNT 5' grandes y complejas (>200 b), las cuales aparentemente, contienen secuencias importantes para diferentes mecanismos de regulación. Esto puede explicar la expresión de manera alterna, a la forma que normalmente siguen la mayoría de RNAm celulares y virales estudiados. Entre estos ejemplos podemos citar a genes que codifican para, factores de crecimiento, receptores de membrana celular, gran parte de proto-oncogenes, proteínas de heat shock, histonas, virus del SIDA (HIV-1), Papilomavirus y proteínas que unen GTP.

INTRODUCCION.

Antecedentes generales:

Poliovirus (virus de la poliomiélitis) es el agente causal de la poliomiélitis, una aguda enfermedad del sistema nervioso central (SNC) de humanos, que ocasionalmente puede resultar en parálisis. Registros recientes apoyados por excavaciones arqueológicas, sugieren que la poliomiélitis ha plagado la humanidad desde la antigüedad.

Del trabajo experimental sobre los diversos tipos antigénicos, patogénesis e inmunidad, se obtuvo la información necesaria para lograr la inmunización artificial. Como resultado de este trabajo, dos excelentes vacunas fueron desarrolladas las cuales han controlado efectivamente la poliomiélitis paralítica en los países donde han sido usadas, por lo que la parálisis espinal infecciosa aguda puede considerarse como rara.

La poliomiélitis no ha sido totalmente erradicada, sin embargo en países donde usan la vacuna viva atenuada (SABIN), un bajo nivel de la enfermedad persiste. **La Organización Mundial de la Salud** estima que al menos 500,000 casos de la enfermedad ocurren anualmente y el número actual parece ser mayor; paradójicamente, mucho de esto parece ser causado por la vacunación. En países del tercer mundo existe un alto índice de poliomiélitis.

Hoy en día está claro que poliovirus es primeramente un patógeno entérico, que ocasionalmente invade el SNC. Es generalmente aceptado que el virus es transmitido via la ruta fecal-oral, por lo tanto se implanta en la mucosa de la garganta (cuando grandes dosis son ingeridas) e intestino. Al igual que otros Enterovirus es estable en el ácido y puede sobrevivir transitoriamente en el

estómago. El virus se multiplica en la mucosa y es capaz de replicarse en la orofaringe y por tanto es posible que, ocasionalmente pueda ser propagado por las heces fecales. Después de que el virus se establece en el tracto gastrointestinal, posiblemente en células epiteliales del intestino, el virus se multiplica en los nodos linfáticos mesentéricos y placas de Peyer; de éste modo resulta la diseminación del virus a los nodos linfáticos sistémicos, torrente sanguíneo y otros sitios de replicación, produciendo una viremia (figura 1).

La aparición del virus en la sangre, coincide con el periodo que es llamado "enfermedades menores", un síndrome inespecífico que ocurre en la mayoría de las infecciones y disminuye de 1-2 días. El mantenimiento de una viremia persistente, es requerido para la invasión del SNC, un raro evento que ocurre en aproximadamente de 1-2% de todas las infecciones. El rango del daño celular por la infección viral va de cromatólisis leve a neurofagia y destrucción completa, existiendo también respuesta inflamatoria de la médula espinal. Ha sido también sugerido que el virus se multiplica productivamente en linfocitos invadidos. En el SNC poliovirus se replica principalmente en las neuronas motoras de la asta anterior de la médula espinal, tallo del cerebro y en la corteza motora. En muchos casos también se observan lesiones en el ganglio intermedio gris y en el asta posterior.

La parálisis resulta cuando la replicación viral destruye gran número de neuronas motoras, en la región del SNC que controlan músculos específicos. El periodo de infección al inicio de la poliomiелitis clínica parálitica es generalmente al rededor de 11 días. En la gran mayoría de individuos la infección se

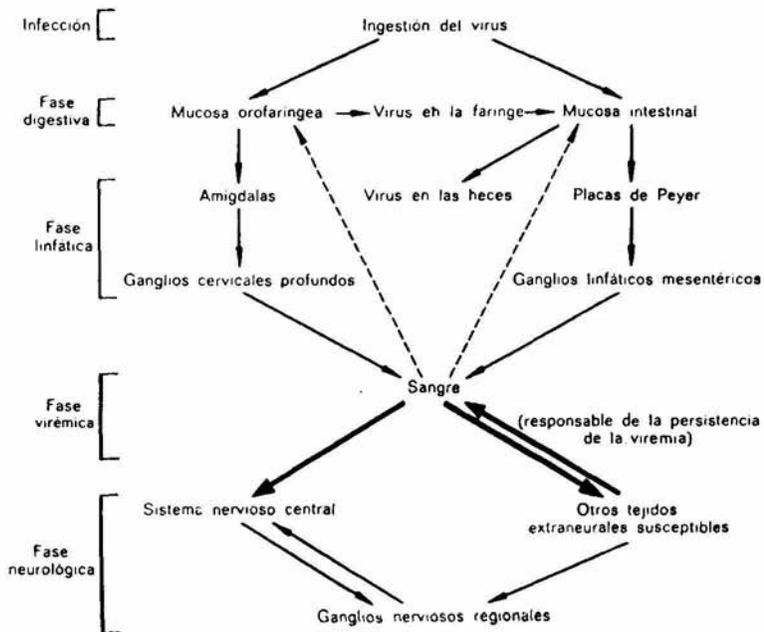


Figura 1. Patogénesis en la poliomielitis.

Modelo basado en una síntesis de datos obtenidos de humanos y chimpances (tomado de 2).

asocia con las "enfermedades menores" que presentan los síntomas de fiebre, malestar, sueño, cefalea, náuseas, vómito y garganta inflamada. Cuando ocurre la poliomielitis parálitica, generalmente es de la forma de una parálisis flácida, que más frecuentemente involucra los miembros inferiores.

El tropismo celular para poliovirus, parece depender del receptor celular como un determinante principal. La limitación basada en el receptor es demostrada en células en cultivo.

Con la infección de poliovirus en células en cultivo, se ha caracterizado el fenómeno de inhibición de la síntesis de macromoléculas de la célula hospedera, principalmente RNA y proteínas. Este fenómeno es una de las primeras y más dramáticas alteraciones inducidas por el virus sobre el aparato transcripcional y traduccional en la célula hospedera.

Poliovirus puede ser transmitido a monos, ratones, ratas y embriones de pollo, pero el humano es el único hospedero conocido en la naturaleza que desarrolla la enfermedad (2, 65, 74).

I) Estructura del virus de la poliomielitis.

Poliovirus es un miembro del género de los Enterovirus y de la familia Picornaviridae (virus pequeños de RNA) (50). Es un virus desnudo, compuesto de una cápside de proteínas, formada por 60 copias (protómeros) de cada una de las 4 proteínas estructurales maduras (VP1, VP2, VP3 y VP4) y de una a dos copias de VP0 (precursor no procesado de VP2 y VP4); esta partícula icosaédrica tiene un diámetro aproximado de 28-30 nm y encierra un genoma de RNA cadena sencilla y polaridad positiva (28, 40).

El RNA viral (RNA_v) tiene unida al extremo 5' una pequeña proteína básica de 22 aminoácidos llamada VPg, con un peso

molecular (P.M) promedio de $2.4-12 \times 10^6$ D (5, 24, 27, 33, 89) y un segmento poliadenilado (poli-A) que tiene en promedio 60 nucleótidos en su extremo 3' (90). VPg se une al RNAv covalentemente mediante un enlace fosfodiéster a la tirosina (tercer aminoácido del extremo NH₂) de VPg, el enlace se representa como O⁴-(5-Uridil) tirosina (tyr-pUp) (figura 2). VPg está codificada en la región P3 del mapa del RNAv (32).

El RNAm de poliovirus empieza en su extremo 5' con un residuo de pUp, a diferencia de la mayoría de los RNAm eucarióticos que empiezan con un residuo de guanina metilada en la posición 7, estructura conocida como "Cap" (6, 39, 58, 75).

La molécula de RNAv está formada por aproximadamente 7500 nucleótidos, con una proporción de bases de Adenina=30.2%; Citosina=23.1%; Guanina=22.8%; Uracilo=23.9% y puede dividirse en una región no traducida 5' (RNT 5') de 743 nucleótidos, una zona de marco de lectura abierta y una región no traducida 3' (RNT 3') de 72 nucleótidos (33, 65).

La región del marco de lectura abierta del RNAv, codifica todas las proteínas estructurales y no estructurales maduras (57, 59). El RNAv y el RNAm son idénticos en secuencia de nucleótidos y sólo difieren en la presencia (RNAv) o ausencia (RNAm) de la proteína VPg (43). El segmento de poli-A del RNAv, se cree participa en la replicación viral, permitiendo la síntesis del RNA de polaridad negativa (14, 77).

Debido a la alta homología en la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos, se cree que los diferentes serotipos de poliovirus derivan de un prototipo común (85).

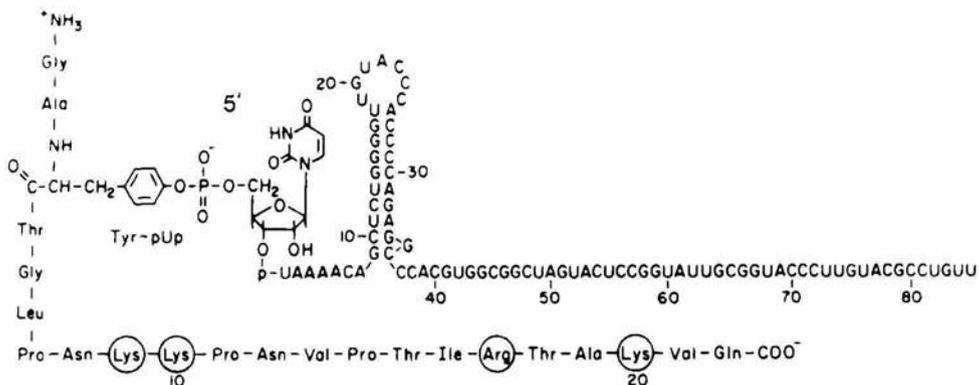


Figura 2. Estructura de la región terminal 5' del RNA de poliovirus.

El oligonucleótido (n=85) es un fragmento del corte del virion con RNasa 111. La proteína viral VPg se une vía un enlace O⁴-(5-Uridil) trosina (tyr-pUp) al RNA. El enlace fosfodiéster en Tyr-pUp puede considerarse rico en energía por analogía con O⁴-(5-Adenil) Tirosina. Las estructuras "tallo y burbuja" tienen un ΔG de -21Kc mol^{-1} (tomada de 33 y 39).

II) Ciclo lítico de poliovirus.

El ciclo replicativo de poliovirus inicia con la unión de la partícula viral (cápside), a un receptor celular específico en la superficie de la célula, y posteriormente, el virus entra en la célula, probablemente a través de endocitosis mediada por el receptor (37, 47). Ciertas evidencias indican que la acidificación extracelular, de algún modo facilita la entrada del genoma viral al citoplasma y bajo condiciones normales, la entrada ocurre en vesículas intracelulares ácidas (56).

Como siguiente paso se realiza el "desnudamiento" del RNAv, el cual es liberado en el citoplasma asociado a proteínas estructurales (12, 48). Penetración y desnudamiento son eventos que parecen ser simultáneos (48). El RNAv actúa directamente como un RNAm, que codifica una poliproteína de aproximadamente 250 KD, la cual es procesada en una forma precisa por al menos dos proteasas virales (25, 26, 57, 86); de éste procesamiento resultan todas las proteínas estructurales y no estructurales maduras (59).

Las proteínas estructurales VP0, VP1 y VP3 se agrupan formando la procápside, que al unirse a una molécula de RNAv forman un complejo ribonucleoprotéico, el cual es conocido como provirión (23). El provirión origina la partícula madura o virión mediante el procesamiento de la proteína VP0 a VP2 y VP4. El ciclo viral finaliza con la liberación de viriones maduros y la lisis celular.

III) Replicación viral.

La síntesis de RNAv es un evento citoplásmico y se realiza independientemente de la maquinaria genética celular. El tiempo

para la síntesis de una molécula de RNAv, se ha estimado en 45 segundos.

En células infectadas por poliovirus se han encontrado tres tipos de RNA: el RNA de una sola cadena con coeficiente de sedimentación de 35 S, un RNA formado por una doble cadena con colas de cadena sencilla, conocido como Intermediario Replicativo (IR) (18 S) y RNA doble cadena llamado Forma Replicativa (FR) (20 S). Este FR es posible que no sea otra cosa que IR que ha finalizado la síntesis de RNA. Las cadenas negativas no son infectivas, pero el IR y FR poseen infectividad (44). El IR contiene en promedio 3 (ocasionalmente 8) colas nacientes de cadena sencilla, las cuales están unidas por puentes de hidrógeno a su molde sobre regiones cortas (70). La mayoría de cadenas en el IR son de polaridad negativa, lo que sugiere que la replicación es ampliamente semiconservativa, la cadena positiva es transcrita al lado de una cadena negativa conservada y éste proceso desplaza la cadena positiva ya existente en el duplex del complejo (44).

La replicación del genoma viral inicia con la síntesis de una molécula de RNA polaridad negativa, la cual sirve de molde para la síntesis de nuevas moléculas de RNA positivo, que pueden ser traducidas o servir como nuevos RNAs capaces de ser encapsidados (2). Se sabe que la replicación del RNAv requiere tanto proteína del hospedero como también viral (84). La proteína viral P3D es una RNA-polimerasa codificada por el virus, tiene actividad de poli-U polimerasa y replicasa (57). Esta proteína es la encargada de la síntesis de RNAv (76). La RNA-polimerasa, requiere de un factor celular para iniciar la síntesis, el cual puede ser una

uridiltransferasa terminal que puede formar un iniciador para el funcionamiento de la polimerasa viral (3, 4).

Se han encontrado complejos de membrana de replicación, que tienen proteínas replicantes del RNA viral (83) que sintetiza oligo-uracilos (VPg-pUp y VPg-pUpUp), que son los extremos 5' terminal de las moléculas de RNA nacientes (11, 84). Esto sugiere que la replicación viral requiere la presencia de membranas celulares.

IV) Traducción y procesamiento.

El RNAv es un RNA monocistrónico, cuyo inicio de traducción está localizado en el nucleótido 743 y el de terminación en el nucleótido 7369 (17). Como resultado de su traducción se realiza la síntesis de una poliproteína precursora cuyo P.M es de 247,000 D, codificada por 2209 tripletes consecutivos en la zona de marco de lectura abierta.

Esta poliproteína es procesada en el estadio naciente, en tres precursores primarios (P1, P2 y P3), los cuales son procesados en una variedad de pequeños productos protéicos específicos del virus. Estos han sido mapeados en el RNA genómico viral por métodos de estudios cinéticos, análisis tripticos, inmunoprecipitación y secuenciación radioquímica principalmente (2, 57, 65).

La zona de marco de lectura abierta, muestra tres sitios principales de corte, deducidos de su estructura primaria que son: Glutamina (Gln)/Glicina (Gly), Tirosina (Tyr)/Glicina y Aspártico (Asp)/Serina (Ser) (33, 57). La poliproteína es procesada predominantemente por la proteasa viral 3C (que corta pares de aminoácidos Gln/Gly), debido a que presenta varios

sitios de corte Gln/Gly, en su secuencia de aminoácidos. La misma proteína 3C es procesada autocatalíticamente (2, 26). La poliproteína es procesada entre la región P1-P2, que presenta los sitios de corte Tyr/Gly, por la proteasa 2A (46). La región P2-P3 presenta el sitio de corte Gln/Gly, que es reconocido por la proteasa 3C (91); de estos procesamientos se generan los precursores P1, P2 y P3 mencionados anteriormente.

El precursor primario P1 da origen, por procesamiento proteolítico, a las 4 proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4; la proteasa 3CD, como ya se mencionó procesa el precursor P1 en VP0, VP1 y VP3 (30), posteriormente VP0 es procesada en VP2 y VP4 en el sitio Asp/Ser (39, 40). Este último procesamiento es dependiente de RNA y está asociado con los pasos de ensamble y maduración del virus (36).

El precursor P2 contiene a las proteínas P2A, P2B y P2C, la proteína P2A actúa de forma indirecta en la degradación de una proteína celular de alto P.M (p220), la cual es importante para la síntesis de proteínas de la célula hospedera (tabla 2) (35, 45). La función de P2B es desconocida. P2C se asocia a una posible función de proteasa (34), aunque su principal función parece estar relacionada en la replicación viral (63, 64).

En el precursor viral P3 se encuentran las proteínas VPg, P3B, P3C y P3D. Como se mencionó, VPg se une al RNAv en el extremo 5', en tanto que 3D es el componente de la replicasa (RNA-polimerasa dependiente de RNA). Se desconoce actualmente la función de P3B (20, 57, 59).

La nomenclatura adoptada y los P.M de las proteínas estructurales y no estructurales se muestran en la tabla 1 (73).

Como se señaló anteriormente, el RNAv tiene dos grandes regiones no traducidas 5' y 3' importantes, que se conservan ampliamente en los tres serotipos. Estas RNT juegan papeles importantes en el proceso replicativo de poliovirus (38, 65).

El mapa propuesto para el procesamiento de poliovirus es ampliamente aceptado y complementado (figura 3) (57, 59).

V) Efecto de la infección viral sobre la célula hospedera.

Los efectos de la infección de poliovirus incluyen la inhibición de la transcripción y traducción de la célula hospedera en la fase temprana de la infección; en la fase tardía es inhibida la replicación del DNA celular (44). Estos efectos influyen también cambios en la membrana plasmática celular, de modo que después de 3 horas de infección el balance iónico es perturbado (36, 55, 79). El ciclo infeccioso es relativamente corto, requiere aproximadamente 6 horas entre la unión al receptor y la lisis celular (44, 65).

V.1) Inhibición de la síntesis de DNA celular.

La inhibición de síntesis de DNA celular es posterior (5 horas) a la inhibición de la transcripción y la traducción. Aunque no se ha podido elucidar el mecanismo de inhibición de DNA, se cree que se debe en gran parte, a que el virus modifica la maquinaria metabólica del hospedero, para la producción de componentes virales (65).

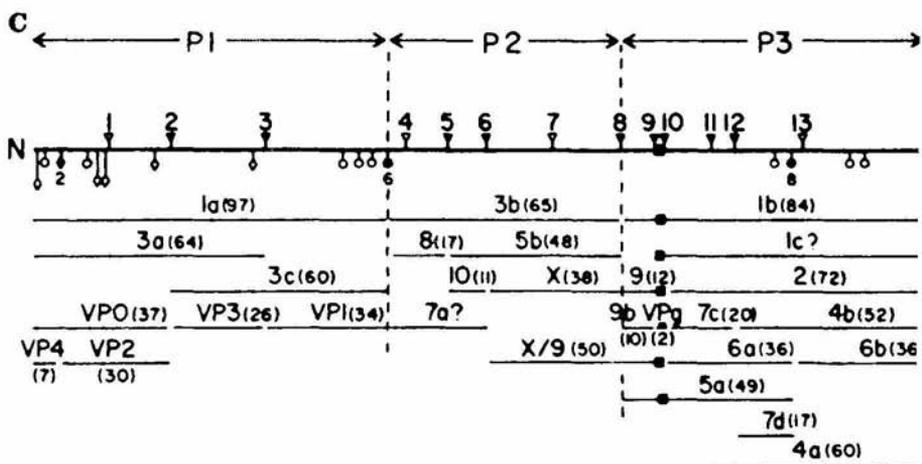
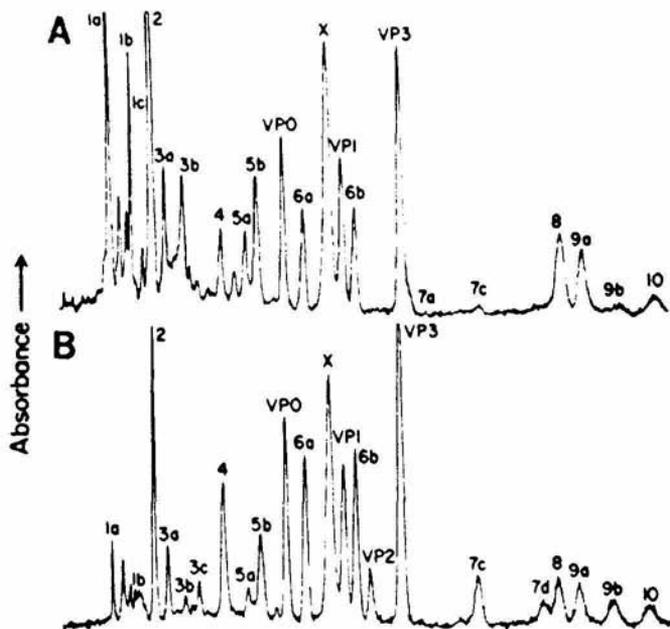
V.2) Inhibición de la síntesis de RNA celular.

Durante la infección de células por poliovirus, la síntesis de RNA dependiente de DNA, es inhibida un 80% después de 90 minutos. Esto se logró establecer por la diferencia de incorporación de precursores radiactivos al RNA celular a

Figura 3. Perfiles electroforéticos y mapa de procesamiento de proteínas virales, encontradas en lisados de células HeLa infectadas por poliovirus.

A) Después de un periodo de 10 minutos de marcado con metionina [35S]. B) Como en A pero con 90 minutos de incorporación con metionina [35S] (tomado de 57).

C) Mapa del procesamiento de la poliproteína viral. La mayoría de los cortes ocurre en los pares Gln/Gly. La poliproteína (línea gruesa) es dividida en tres regiones (P1, P2 y P3). Los pares de aminoácidos (sitios) conocidos que son cortados, son indicados por símbolos negros. Los sitios Gln/Gly son procesados por la proteasa P3-7C, la proteasa P3C es codificada por el virus. Las proteínas responsables para el procesamiento de los sitios NS-2, YG-6 y YG-8 no han sido bien identificadas. Las proteínas p3-4a, X/9 y 3b/9 son producidas únicamente en pequeñas cantidades (tomado de 59).



diferentes tiempos de infección (36).

Estudios tendientes a determinar la causa de la inhibición de la transcripción, han determinado que varias proteínas de la región P2 y P3 del genoma viral se encuentran en el núcleo de células infectadas, estas proteínas se acumulan en un porcentaje que es directamente proporcional al decremento en el porcentaje de síntesis de RNA celular (9, 23a). Por otro lado, la subunidad II0 de la RNA-polimerasa se modifica en las células infectadas, aunque hasta el momento no se sabe si la modificación se debe a defosforilación o degradación. Con respecto a los factores de transcripción, recientemente se ha sugerido la modificación de dos de ellos: uno general para varios promotores, como es el factor TFIID, el cual interactúa con la caja "TATA" y otro específico para el promotor tardío de Adenovirus 2 (factor USF), el cual interactúa con la región comprendida entre los nucleótidos -50 a -65 del promotor tardío del mismo virus (42).

A pesar de que se han encontrado diversas modificaciones en factores y en la RNA-polimerasa, no es posible determinar si una sola modificación es producida por el virus, y el resto sea una consecuencia de la modificación inicial. Sin embargo, es posible que más estudios sobre el proceso aclaren el mecanismo inhibitorio.

V.3) Inhibición de la síntesis de proteína celular.

Dentro de los 30-60 minutos post-infección, la síntesis de proteínas de la célula hospedera se inhibe dramáticamente. Este fenómeno conocido como "Shutoff" celular no permite la traducción de RNAm con "cap" y conduce a la traducción preferencial de los RNAm sin "Cap" del virus (10, 36, 79, 88).

Las primeras proteínas específicas de poliovirus aparecen cerca de la segunda hora post-infección, alcanzando su máximo de expresión a las 3-4 horas. En el estadio final de infección, la síntesis de proteínas virales decrece dramáticamente, reflejando una disminución de los recursos celulares y señalando la inminente muerte celular (21, 36, 79). Detallados análisis indican que el bloqueo de la síntesis de proteína celular, está en el paso de iniciación de la traducción. La vida media de los RNAm celulares no se modifica a consecuencia de la infección por poliovirus (18, 46, 79).

Para entender el mecanismo por el cual poliovirus inhibe la traducción del RNAm celular, se requiere entender el funcionamiento de las proteínas que interactúan con la RNT 5' de los RNAm celulares durante la iniciación de la traducción. La tabla 3 enlista los factores eucarióticos de iniciación (eIF) y su probable función en la traducción. Se ha de mostrado que la estructura "Cap", facilita la formación estable del complejo entre la subunidad ribosomal 40S y el RNAm, durante la iniciación de la traducción. La función del "Cap" es ayudar a la interacción específica RNAm-proteína (18, 79).

De los diferentes modelos propuestos para explicar el "Shutoff" celular, los más estudiados, y que no son mutuamente excluyentes, son: a) un incremento en la concentración de iones monovalentes (Na^+ y Cl^-), dentro de la célula hospedera y b) la inactivación de un factor eucariótico de iniciación (18, 21, 55, 79).

a) La eficiencia en la traducción relativa de un RNAm, es dependiente de las condiciones iónicas del medio ambiente. Al estabilizarse la estructura secundaria del RNAm, por altas

concentraciones de sal, también hay un incremento en la dependencia de la proteína unidora del "Cap" (CBP) para la traducción. La infección por poliovirus causa cambios en la membrana celular, alterando su permeabilidad a los iones. La perturbación resultante de los gradientes anormales de los iones monovalentes, trae como consecuencia el incremento de la concentración de Na^+ , sin decremento en la concentración de K^+ . Se propone que la unión de una proteína de la cápside viral a la membrana celular, es la responsable de los cambios en los gradientes iónicos. El incremento de Na^+ señalado dentro de la célula hospedera, puede conducir a la inhibición de la síntesis de proteína celular. La traducción "in vitro" del RNAV es relativamente resistente a la inhibición por altas concentraciones de sal. De estos cambios en condiciones intracelulares, puede resultar la traducción preferencial del RNAm viral (36, 55, 56, 79).

b) Inactivación de un factor eucariótico de iniciación.

El continuo estudio de los eIF, ha proporcionado las bases para postular que la infección inducida por poliovirus, provoca la inactivación de un factor específico de iniciación (21), por lo cual no se realiza la unión del ribosoma al extremo 5' del RNAm (46). El sitio de este defecto está localizado en el complejo de la proteína que se "une al Cap" (CBPC) (46, 72).

La figura 4 muestra las posibles funciones de cada uno de los componentes del CBPC, en el paso de iniciación de la traducción. El CBPC, consiste de un polipéptido asociado de 24, 220 y cantidades menores de los polipéptidos de 40, 44 y 80 KD. En células infectadas, el CBPC sufre alteraciones estructurales, la

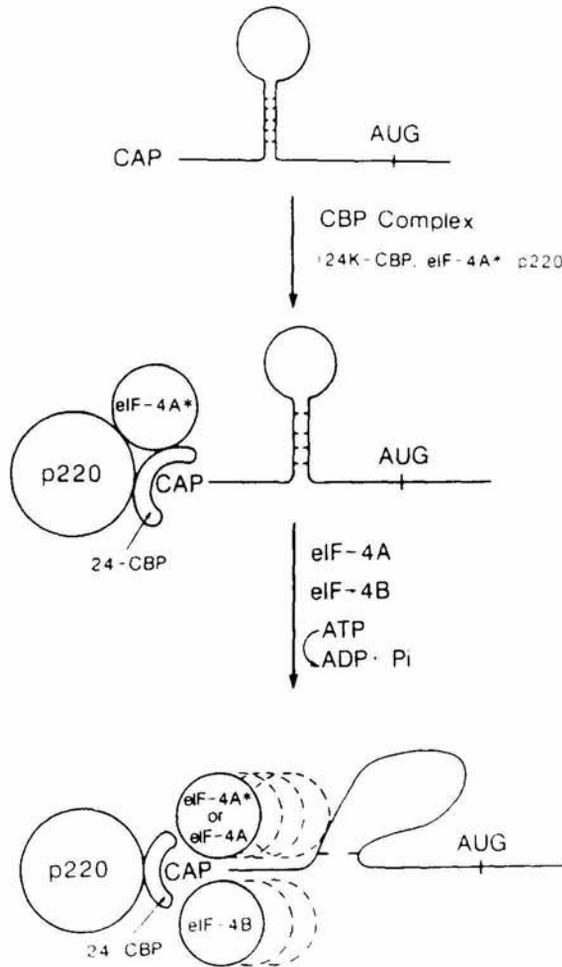


Figura 4. Modelo para la función de eIF-4A, eIF-4B y el complejo CBP en la iniciación de la traducción.

eIF-4A representa al componente eIF-4A del complejo CBP (tomado de 79).

proteína de 220 KD (p220) está ausente, en su lugar se encuentran 2-3 productos de degradación (100-130 KD) antigénicamente relacionados (10, 21). Ensayos "in vitro" demuestran que la actividad proteolítica de p220, es dependiente de la temperatura (la proteólisis no ocurre a 0 °C y sensitiva al calor. Otra alteración es que el eIF-4A, se disocia más rápidamente del complejo modificado que del complejo nativo (10, 18, 79).

El CBPC alterado permite la traducción "in vitro" de los RNAm sin "Cap" pero no de los RNAm con "cap" (10, 36, 46, 79). De lo anterior se observa que la integridad del componente p220, es esencial para la función del CBPC y que su degradación, es un factor importante en la inhibición o "Shutoff" de la traducción de las proteínas celulares (18, 21, 46, 79). El procesamiento de p220 es inducido indirectamente por la proteasa viral 2A (35), aunque la degradación de este componente, no es totalmente fundamental* para explicar la inhibición de la síntesis de proteínas celulares (8). Se sugiere que el CBPC, utiliza energía derivada de la hidrólisis del ATP, mediante su fusión a la RNT 5' del RNAm para facilitar la unión del ribosoma. Los RNAm sin "Cap", muestran una menor dependencia al ATP para la unión del ribosoma. La estructura "Cap" y la hidrólisis de ATP, son aspectos relacionados en la iniciación de la traducción.

Recientes experimentos, sugieren que el "Shutoff" temprano en células HeLa infectadas (por virus) es debido a la fosforilación de eIF-2 α (79).

La inactivación de un factor o factores de iniciación de traducción y el hecho de ser independiente de "Cap" sugieren, y de hecho se ha demostrado, que determinada secuencia en la RNT 5'

confiere esta característica (7, 10, 60, 61). La rapidez y duración del "Shutoff", varia ampliamente con los diferentes tipos de virus y es también dependiente de la especie del hospedero (29).

ANTECEDENTES PARTICULARES.

I) Atenuación y virulencia.

Los virus con genomas de RNA, son los parásitos más ubicuos conocidos, se encuentran intracelularmente en casi todas las formas de vida (plantas, animales, hongos y procariotes). Son diversos en tamaño, estructura, organización genómica y estrategia de replicación; han sido clasificados en diversos grupos, basándose en estos y otros criterios. Estos virus son objeto de extensos estudios, por que son los agentes responsables de una variedad de importantes enfermedades del hombre, animales y plantas. Los porcentajes de evolución de estos virus, continuamente en replicación, excede en un millón de veces los porcentajes de evolución de sus hospederos. Las diferencias en los porcentajes de evolución del DNA y RNA, radica en los pequeños tiempos generacionales para la replicación del RNAV y el error natural de la RNA-polimerasa viral (comparada con la DNA-polimerasa) y por los mecanismos de rearreglo y recombinación (80, 100).

Los estudios de la neurovirulencia son complicados, por el hecho de que diferentes animales pueden ser empleados: monos (Cynomolqus y Rhesus), chimpances y ratones. Las diferentes rutas de inoculación que pueden ser usadas son: intracerebral (inoculación en el tálamo), intraespinal (inoculación en el asta anterior), intraperitoneal, intramuscular y oral; tanto el animal

empleado y la ruta de inoculación, pueden influenciar la neurovirulencia de una cepa viral particular.

Hay dos métodos para cuantificar la neurovirulencia de poliovirus, un método es inocular muchos animales, para posteriormente observar los signos de parálisis (debilitamiento de miembros o parálisis parcial, cuadriplejia postrante o fallas respiratorias y muerte). Un segundo método es emplear monos, para determinar la magnitud de las lesiones neuropatológicas en el SNC, que es proporcionado asignando valores en una escala de 1-4 (1= solo infiltración celular; 2= infiltración celular con daño neuronal mínimo; 3= infiltración celular con extenso daño neuronal y 4= daño neuronal masivo con o sin infiltración celular), a cada sección microscópicamente examinada. Para cada mono usado en el examen se le asigna un valor y una media es calculada para cada virus. Altos valores de lesión son asociados con virus de alta neurovirulencia; usando estos métodos, es posible asignar valores numéricos a la neurovirulencia polioviral. La **Organización Mundial de la Salud**, recomienda el método sensitivo de inoculación intraespinal de monos Cynomolgus, con un inóculo de $10^{5.5}$ - $10^{6.5}$ en 0.1 ml; los resultados se comparan con los de una cepa aceptada como referencia, para la fabricación de vacunas confiables (2, 65).

La vacuna oral más utilizada en el mundo, es la que se obtiene de cepas atenuadas de poliovirus y fue creada por **ALBERT SABIN** en la década de los 50. Aunque la vacuna es confiable y se ha usado por muchos años para controlar la poliomielitis, se ha observado reversión a la neurovirulencia de la cepa vacunal, principalmente de los serotipos 2 y 3 (22,31, 49, 74). Se ha observado, que una

mutación puntual en el nucleótido 472 de la RNT 5' del serotipo 3, cambia drásticamente las características de una cepa viral (22, 69, 81, 82). Se sabe que la cepa de la vacuna oral tiene uracilo (U) en este nucleótido, lo cual le confiere el fenotipo atenuado y las cepas virulentas tienen citosina (C) en esta posición, lo que le confiere el fenotipo neurovirulento (22). En los casos de parálisis asociada a la vacuna SABIN, la reversión de esta cepa atenuada al fenotipo neurovirulento, obedece al cambio puntual de U por C en el nucleótido 472 (22, 69). La mutación puntual que provoca la reversión a la neurovirulencia opera del mismo modo, en los modelos experimentales de monos y ratones (41).

Anteriormente el análisis y fabricación de vacuna oral contra la poliomielitis resultaba muy caro, por que implicaba el utilizar grandes números de monos para lograr esta meta. Hoy en día gracias a la construcción de virus quiméricos, se ha podido adaptar un modelo experimental en ratones, el cual permite estudiar el efecto a nivel molecular de las mutaciones puntuales y seguir el proceso de atenuación, virulencia y reversión con el consecuente bajo costo de los exámenes. Gracias a este nuevo modelo, la fabricación de vacuna contra la poliomielitis ya no depende de los modelos de monos y chimpances en un cien por ciento (41).

Sobre la base del examen de sueros neutralizantes, poliovirus puede dividirse en tres serotipos: P1/MAHONEY; P2/LANSING y P3/LEON. Los sitios antigénicos principales de neutralización, se encuentran en segmentos definidos de las proteínas estructurales VP1 y VP3, variando la inmunodominancia para cada serotipo (19,

52, 54, 87). De la estabilidad antigénica del virus, también dependen los brotes epidémicos en las poblaciones vacunadas (51, 53, 68).

II) Región no traducida 5' (RNT 5').

La hipótesis de que la RNT 5', conservada a través de un largo proceso evolutivo, tendría un papel esencial para la replicación y otras funciones virales en poliovirus (58), ha empezado a estudiarse y se ha aceptado su veracidad paulatinamente. Las funciones de esta región, se han logrado elucidar por experimentos de recombinación genética (1), construcción de virus quiméricos (41), mutagenesis dirigida, deleciones e inserciones (38) y estudios computacionales (69). La gran RNT 5' tiene 750 nucleótidos de longitud (el número exacto varía entre los diferentes serotipos). Dentro de esta región 5', se encuentra el codon AUG de iniciación, que está localizado en la posición 743 y es precedido por varios codones AUG (8 para poliovirus tipo 1) (33). Se sabe que algunos de estos codones pueden codificar pequeños péptidos de hasta 7000 D, pero su función es desconocida; de todos los codones AUG anteriores al codon AUG de iniciación de la traducción, solamente tres han sido conservados entre los genomas de los tres serotipos (posiciones 322, 464 y 593) (85).

La RNT 5' es la región más conservada del genoma entre los Enterovirus y entre los Enterovirus y Rhinovirus. Hay evidencias de que tiene una extensa estructura secundaria en poliovirus y otros miembros de los Picornavirus. Se ha encontrado, que la mutación puntual en la RNT 5' del genoma viral (posición 472 en poliovirus tipo 3 y 2 y 480 en poliovirus tipo 1), puede afectar

dramáticamente la replicación "in vitro" en intestino y médula espinal, pero no afecta la replicación en cultivos celulares. El único cambio de nucleótido (C por U) en la posición 472, vuelve al virus incapaz de replicarse e incapaz de causar daño patológico en el cerebro de ratón, lo que sugiere que los factores involucrados, en la limitación del crecimiento del virus, es el mismo en primates (tipo 3) y en ratones (tipo 2) (2, 41).

En lo que respecta al fenómeno de replicación, se ha encontrado (por deleciones e inserciones en la RNT 5') que la secuencia entre la posición 551-563, tiene información genética que juega un papel esencial en la replicación viral y la secuencia entre la posición 564-599, tiene información genética que mantiene la eficiencia de ciertos pasos en la replicación viral. Se ha encontrado también que los genomas de los tres serotipos virales, contienen secuencias altamente variables (segmento 640-742), que aparentemente no tienen función en la replicación y secuencias altamente homólogas (segmento 509-639). Los diferentes loci alrededor de la posición 200-500, deben interactuar mutuamente; éstas interacciones pueden resultar en la formación de una estructura funcional, que influencia la eficiencia de ciertos pasos en la replicación (38). La RNT 5' contiene determinantes principales de atenuación, estas funciones probablemente, son mediadas por la interacción de polipeptidos celulares con la RNT 5'.

Recientemente se ha demostrado por análisis de retardamiento y mapas de huellas ("Footprinting"), la unión específica de proteínas celulares con la secuencia de 510-629; también se

observó la formación de éste complejo, con una segunda secuencia (97-182) menos estable con respecto a la primera secuencia en la RNT 5'. Estas dos regiones de la RNT 5', fueron reconocidas por diferentes proteínas celulares, sin embargo los dos complejos (RNA-proteína) contienen el factor eIF-2 α (15). También se demostró que los ribosomas se unen directamente, en una parte interna de la RNT 5' (62). Parece ser que el segmento 320-627, es la región esencial para la unión del ribosoma y traducción del RNAm sin "Cap" (7).

Otros análisis sugieren que la RNT 5', tiene efectos significantes sobre la eficiencia traduccional (65). Un elemento funcional de acción-cis, dentro de la RNT 5' del RNA polioviral, permite la traducción en una forma independiente del "Cap". Este elemento, está localizado entre los nucleótidos 320-631 del extremo 5' del RNAv. Por otro lado, cuando esta región (320-631) se une a un RNA heterólogo, puede funcionar en "cis" para volver a este RNAm, independiente del "Cap" (60). Se ha encontrado también un elemento(s) inhibitorio(s) de acción-cis en la RNT 5', entre el nucleótido 70-381 que limita la traducción del RNAm viral, en lisados de reticulocitos de conejo, extracto de germen de trigo y oocitos de Xenopus laevis, pero sin actividad para extractos de células HeLa (61).

Otros posibles papeles que puede mediar la RNT 5' en forma importante son: la unión de la RNA-polimerasa viral al extremo 3' del RNA de cadena negativa y/o tal vez en el empaquetamiento y ensamble del RNA de cadena positiva en los viriones etc. (7, 69). El mejor conocimiento de la función de la RNT 5', puede formar la base de nuevas vacunas atenuadas, incapaces de revertir a la

neurovirulencia (60, 65).

III) Estructura secundaria de la RNT 5'.

Como se mencionó anteriormente, el hecho de que la RNT 5' esté altamente conservada, sugiere que tiene un papel funcional para diferentes pasos esenciales del ciclo viral. Tales funciones pueden depender de la estructura secundaria del RNAv (69). Por análisis de secuencias, se sugiere que la mutación en la posición 472, puede producir un cambio significativo en la estructura secundaria de la RNT 5' (2).

Se ha mostrado que la posible estructura secundaria de la RNT 5', del RNAv de la vacuna oral SABIN y de un virus aislado P3/119 (revertante de un caso de parálisis fatal), un cambio de U por C en la posición 472 en la vacuna oral, causa un substancial rearrreglo, de modo que dos estructuras adicionales (tallo y burbuja) son formadas. También se infirió una estructura similar a la de P3/119, en el progenitor virulento (P3/León/37) de la vacuna oral SABIN.

En el serotipo 3 (virulento) un solo cambio del nucleótido U por C, en la posición 472 en la RNT 5', proporciona una ventaja selectiva para crecer en el intestino humano. Este cambio está asociado con un incremento en la neurovirulencia. La mutación U por C, parece tener un profundo efecto en la estructura secundaria, predecida para la RNT 5' del genoma viral.

Es posible que cambios análogos sean importantes también en la atenuación de poliovirus tipo 1 (posición 480) (22, 78).

Otra técnica de análisis comparativo de secuencias reveló la presencia de más de 22 horquillas (tallos y burbujas), conservadas en las cepas atenuadas y virulentas de poliovirus,

además de otras estructuras también conservadas. Los 22 tallos son formados por 209 de los primeros 634 nucleótidos, lo que comprende casi el 45% de la RNT 5', el otro 55% esta formando burbujas. Se encontró que todos los Picornavirus contienen estructuras RNT 5' de longitud similar y regiones de secuencias y/o estructuras similares.

Se ha encontrado también que dos secuencias ricas en pirimidina, se extienden del segmento 91-101 y 555-576, y dos secuencias altamente conservadas, que se extienden del segmento 446-470 y 536-565. Se cree que la secuencia conservada del tallo "R" (figura 5) es reconocida por el ribosoma o algún factor que inicie la traducción, y podría ser que la región siguiente sea cadena sencilla la cual es escudriñada por el ribosoma, para localizar el AUG iniciador. Los virus silvestres contienen un tallo "R" muy largo y estable. Los únicos virus que no forman éste tallo "R" perfectamente, son las contrapartes atenuadas, debido a la mutación C-U en la posición 472.

La región que va del nucleótido 634 al codón AUG iniciador, muestra un grado muy bajo de homología y por tanto, se cree que no tenga estructura secundaria estable, lo que está de acuerdo con la hipótesis de que el ribosoma examina esta región, para localizar el sitio AUG de iniciación. La falta de estructura secundaria y un AUG claramente expuesto al final de esta región, puede facilitar la iniciación de la traducción. Esto puede determinar en parte la independencia a la proteína unidora del "Cap" en estos virus.

Segun el primer modelo, la base 472 se aparea con la base 482, mientras en el segundo modelo (figura 5), la base 472 se une a la

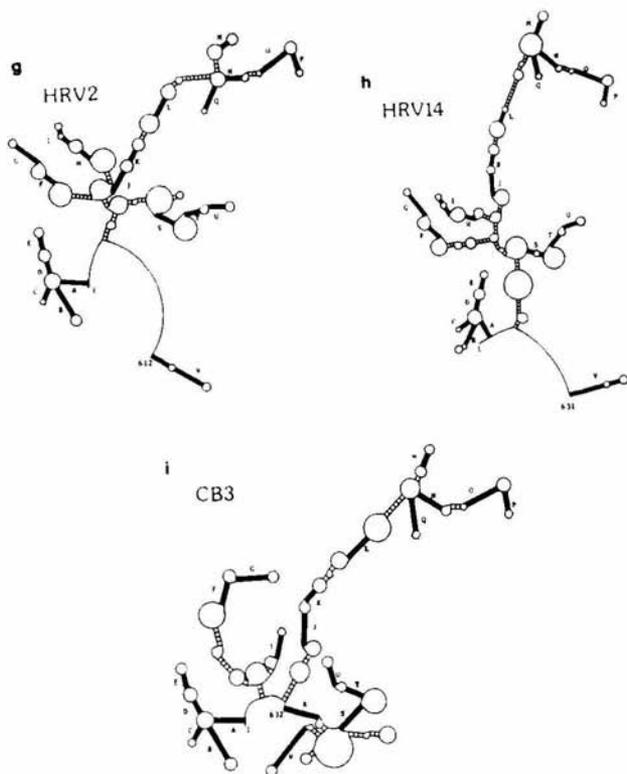


Fig 3—Continued

Figura 5. Predicción de la estructura secundaria de la RNT 5' de los tres serotipos de poliovirus.

Los tallos conservados son sombreados y marcados con letras.

PV= poliovirus cepas silvestres.

PVS= poliovirus cepas atenuadas. (tomado de 69).

base 532 y se localiza en el tallo llamado "R", mientras la base 482 se encuentra en el tallo "S". Se sugiere que los tallos "R y S" son muy estables (69). Una modificación en ambas bases (472 y 482) para regenerar la complementariedad propuesta en el primer modelo, probablemente altere considerablemente la estructura secundaria de la RNT 5', según el segundo modelo.

Hasta el momento, no se conoce con exactitud la estructura secundaria real de la RNT 5' y todo se basa en los modelos propuestos por análisis de computadora, sin embargo es difícil hacer predicciones que favorezcan uno u otro modelo. Recientemente se han propuesto dos nuevos modelos de la estructura secundaria del RNA de la RNT 5', basados además de consideraciones computacionales en ensayos químicos, bioquímicos y biológicos (figura 6 y 7) (96, 98). Modelos que como el anterior de la figuras 5, comparten algunas características similares y otras que son completamente diferentes, por lo tanto no es posible proponer un modelo consenso, para la estructura secundaria del RNA de la RNT 5' del virus de la poliomiелitis.

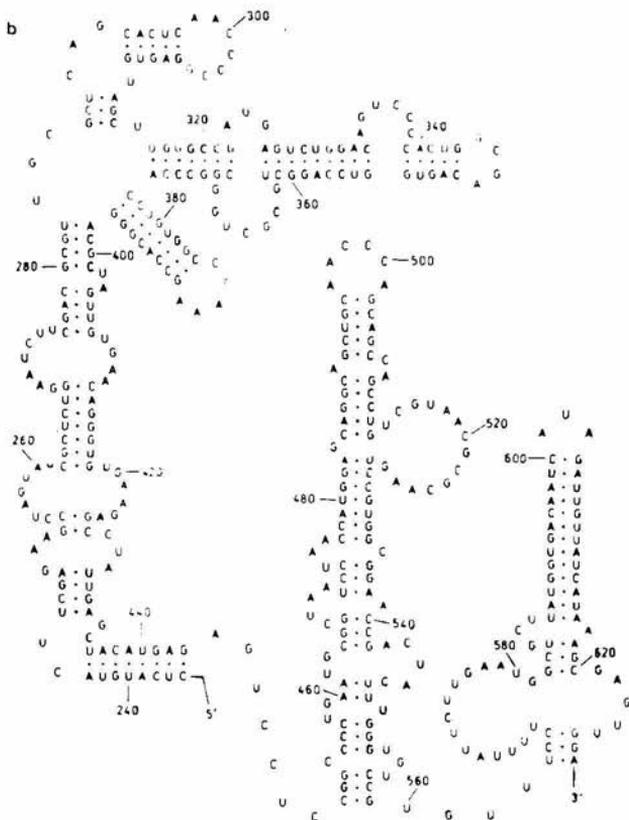


Figura 6. Modelo del plegamiento de la porción central del RNA de la RNT 5' (236-628 b) de la cepa LEON/37 tipo 3 (tomado de 96).

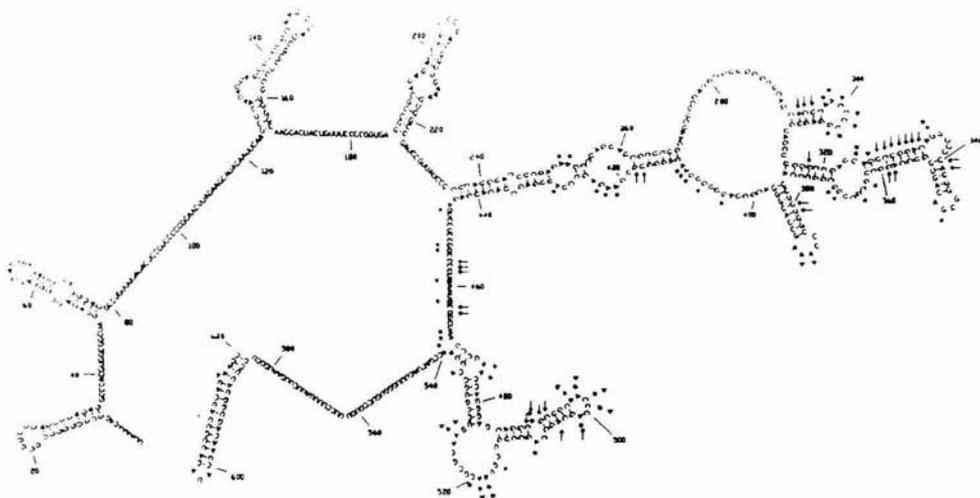


Figura 7. Predicción de la estructura secundaria de la RNT 5', del RNA (1-620 b) de la RNT 5'polioviral tipo 3, basado en análisis comparativo de secuencias.

La figura muestra las estructuras de pares de bases, que fueron predecidas por programas de computadora. Los sitios de modificación química preferencial y corte con RNasa son también indicados: (O) Kethoxal, (●) DMS, (Δ) RNasa A, (▲) RNasa T2 y (→) RNasa CV1 (tomado de 98).

OBJETIVOS.

Dada la importancia que presenta la RNT 5' del RNAm viral, en la regulación de diversas funciones del ciclo de vida de éste agente infeccioso, es importante el estudio y conocimiento a nivel molecular de sus segmentos, factores protéicos celulares que interactúan con esta estructura y la propia estructura secundaria de esta parte del mensajero.

Entender el o los mecanismos de atenuación y reversión a la virulencia, de éste virus en modelos animales. Lo anterior puede permitir posteriormente, la fabricación de vacunas estables para ser empleadas en campañas de vacunación en humanos.

De igual manera, el estudio de esta región altamente regulatoria, puede ayudar a comprender mecanismos alternos para la expresión de genes, por una vía diferente al reconocimiento de la estructura "Cap" presente en la mayoría de los RNAm.

Para contribuir al esclarecimiento de algunas de las funciones regulatorias de la RNT 5' "in vitro", nos planteamos los siguientes objetivos:

- A) Analizar la interacción de factores protéicos celulares con la RNT 5' del RNAv, obtenida de cepas silvestres (virulentas) y atenuadas (mutada en la base 472 y mutada en las bases 472 y 482).
- B) Analizar el efecto de las mutaciones mencionadas, sobre la estructura secundaria la RNT 5' del RNAv.
- C) Analizar la participación de los tres dominios (I, II, III) sugeridos recientemente, en la estructura de la RNT 5', y en la formación de complejos ribonucleoprotéicos (cRNPs).

MATERIALES.

1.0 Material biológico.

1.1 Células. Se usaron en este trabajo células HeLa crecidas en monocapa, a una confluencia de 60-70%.

1.2 Virus. Se usó la cepa del virus de la poliomielitis LEON/37 tipo 3 y P2/LANSING, propagados en el laboratorio por diluciones seriadas.

1.3 Bacterias. Se usaron bacterias E. coli DH5 α .

1.4 Suero. Se empleo suero de caballo inactivado, para el cultivo de células HeLa.

2.0 Medio de cultivo, medio Dulbecco (D-MEM).

SOLUCIONES.

3.0 Soluciones para extracción de DNA (plásmidos).

3.1 Medio de cultivo bacteriano (ML= Medio Luria).

Medio ML.

Bacto-triptona 10 gr.

Bacto-extracto de levadura 5 gr.

NaCl 5 gr.

H₂O bidestilada hasta un litro.

Ajustar pH a 7.5 con NaOH.

3.2 Solución para resuspender bacterias.

Solución TS.

Sacarosa 25%.

Tris-HCl pH 7.5 50 mM.

3.3 Solución para fraccionamiento celular.

Solución ELT.

EDTA 100 mM.

Lizosima 2 mg/ml.

| | |
|--|---------|
| Tritón X-100 | 0.1%. |
| 3.4 Solución para precipitar ácidos nucleicos (PEG6000-NaCl). | |
| Solución PEG6000-NaCl. | |
| PEG6000 | 20%. |
| NaCl | 1 M. |
| 3.5 Solución para resuspender ácidos nucleicos. | |
| Solución TE 1X. | |
| Tris-HCl pH 8 | 10 mM. |
| EDTA | 1 mM. |
| 4.0 Soluciones para geles de agarosa y agarosa bajo punto de fusión (LMP). | |
| Agarosa o agarosa LMP en TBE 1X. | |
| 4.1 Amortiguador TBE 10X. | |
| Tris base | 10 gr. |
| Acido bórico | 55 gr. |
| EDTA | 9.3 gr. |
| H ₂ O bidestilada hasta un litro. | |
| 4.2 Amortiguador TBE 1X. | |
| TBE 10X | 100 ml. |
| H ₂ O bidestilada | 900 ml. |
| 4.3 Amortiguador TBE 0.5X | |
| TBE 10X | 50 ml. |
| H ₂ O bidestilada | 950 ml. |
| 5.0 Soluciones para geles nativos de poliacrilamida. | |
| Solución stock de acrilamida-bisacrilamida (16%). | |
| Acrilamida | 32 gr. |
| Bisacrilamida | 0.4 gr. |
| H ₂ O-DEP, deionizada con amberlita y filtrada (millipore 0.45) 200 | |

ml.

Solución de poliacrilamida.

TBE 10X 2 ml.

Stock de poliacrilamida 18 ml.

Llevar a 40 ml con H₂O-DEP

5.1 Soluciones para polimerizar poliacrilamida.

TEMED 60 µl.

Persulfato de amonio (0.1 mg/ml) 200 ml.

6.0 Solución agua-Dietilpirocarbonato (H₂O-DEP).

DEP 100 ul, para cada 100 ml de H₂O bidestilada.

Se agita fuertemente y se esteriliza de 4 a 24 horas después.

7.0 Solución de bromuro de etidio para teñir geles de agarosa.

Bromuro de etidio 10 mg/ml.

8.0 Soluciones para plaqueo de virus.

8.1 Medio DEM 2X; suero de caballo 10%; antibiótico.

Dextrosa 3.5 gr.

Bicarbonato de sodio 3.7 gr.

Medio DEM 9.95 gr.

HEPES 5.95 gr.

H₂O bidestilada estéril 500 ml.

Ajustar pH a 7.2

Filtrar a través de membrana de 0.22 nm en campo estéril.

8.2 Solucion para diluciones virales.

PBS más suero de caballo 0.2%.

NaCl 8 gr.

KCl 0.2 gr.

Na₂HPO₄ 1.15 gr.

KH₂PO₄ 0.2 gr.

| | |
|--|----------|
| H ₂ O bidestilada | 100 ml. |
| 8.3 Soluciones para fijar monocapa celular. | |
| Acido tricloroacético 20% (TCA) en H ₂ O bidestilada. | |
| 8.4 Solución cristal violeta (C.V) para teñir monocapa celular. | |
| C.V Solución stock. | |
| C.V | 1.09 gr. |
| Etanol al 20% | 99 ml. |
| Solución de trabajo. | |
| Solución stock | 20 ml. |
| Etanol al 95% | 40 ml. |
| H ₂ O bidestilada | 150 ml. |
| 9.0 Solución fenol saturado con tris-HCl. | |
| Ver métodos. | |
| 9.1 Solución fenol-cloroformo (1:1). | |
| Fenol saturado con tris-HCl más cloroformo puro. | |
| 10.0 Solución de etanol al 70%. | |
| Alcohol etílico al 100% | 70 ml. |
| H ₂ O bidestilada | 30 ml. |
| 11.0 Solución para precipitar ácidos nucleicos | |
| NaOAc | 3 M. |
| Ajustar pH a 5.2 con ácido acético. | |
| 12.0 Amortiguador muestra para gel de agarosa. | |
| Sacarosa | 12.5 gr. |
| TBE 10X | 12.5 ml. |
| SDS 10% | 2.5 ml. |
| Azul de bromofenol | 125 mg. |
| Xilen-xianol | 125 mg. |
| 13.0 Solución para ligación de fragmentos de DNac. | |

Amortiguador de ligasa 1X.

| | |
|-------------------|---------|
| Tris-HCl pH 7.5 | 50 mM. |
| MgCl ₂ | 100 mM. |
| DTT | 2 mM. |
| ATP | 1 mM. |

14.0 Soluciones para células competentes.

14.1 Medio Psi-A.

| | |
|------------------------------|---------|
| Bacto extracto de levadura | 5 gr. |
| Bacto-triptona | 20 gr. |
| MgSO ₄ | 5 gr. |
| Bacto agar | 14 gr. |
| H ₂ O bidestilada | 100 ml. |
| Ajustar pH a 7.6 con KOH. | |

14.2 Medio Psi-B.

Igual que Psi-A pero sin bacto agar.

14.3 Solución TFB 1.

| | |
|--|---------|
| KAc | 30 mM. |
| KCl | 100 mM. |
| CaCl | 10 mM. |
| MnCl ₂ | 50 mM. |
| Glicerol 100% | 15 ml. |
| H ₂ O bidestilada hasta 250 ml. | |
| Ajustar pH a 5.8 con ácido acético. | |

14.0 Solución TFB 2.

| | |
|-------------------|--------|
| MOPS | 10 mM. |
| CaCl ₂ | 75 mM. |
| KCl | 10 mM. |
| Glicerol 100% | 15 ml. |

H₂O bidestilada hasta 200 ml.

Ajustar pH a 6.5 con KOH.

15.0 Soluciones para transformación celular.

15.1 Solución β-mercaptoetanol.

β-mercaptoetanol 9 μl.

H₂O bidestilada 491 μl.

16.0 Medio selectivo MAC-B/ampicilina.

Medio Maconkey 40 gr.

Lactosa 10%.

Ampicilina 50 μg/ml.

17.0 Soluciones para extracto citoplásmico total.

17.1 Solución para despegar células.

Tris-HCl pH 7.5 40 mM.

EDTA pH 7.5 1 mM.

NaCl 150 mM.

17.2 Amortiguador RSB.

Tris-HCl pH 7.5 10 mM.

NaCl 10 mM.

18.0 Extracción de DNA por cloruro de cesio (CsCl).

18.1 Solución para amplificar DNA (plásmidos).

Cloranfenicol 125 μg/ml.

18.2 Solución para fraccionamiento celular.

Lizosima 10 mg/ml.

Tris-HCl pH 7.5 0.25 mM.

18.3 Solución EDTA.

EDTA pH 7.5 0.2 M.

18.4 Solución "Tritón juice".

tritón X-100 10% 10 ml.

| | |
|---|------------|
| EDTA pH 7.5 0.5 M | 25 ml. |
| Tris-HCl 1M pH 7.5 | 10 ml. |
| H ₂ O bidestilada | 160 ml. |
| 18.5 Solución de bromuro de etidio. | |
| Bromuro de etidio 10 mg/ml | 200 µg/ml. |
| 18.6 Solución para eliminar bromuro de etidio. | |
| Solución de isopropanol-agua-sal. | |
| Ver métodos. | |
| 18.7 Solución para dializar muestras de DNA. | |
| Tris-HCl pH 7.5 | 5 mM. |
| EDTA | 0.5 mM. |
| H ₂ O bidestilada | 1000 ml. |
| 18.8 Solución para lavar tubos para extraer DNA por cloruro de cesio. | |
| Tris-HCl pH 7.5 | 10 mM. |
| EDTA | 1 mM. |
| H ₂ O bidestilada | 1000 ml. |
| 19.0 Soluciones para transcripción "in vitro". | |
| 19.1 Amortiguador de transcripción TB 5X. | |
| Tris-HCl pH 8.0 | 20 mM. |
| MgCl ₂ | 40 mM. |
| NaCl | 250 mM. |
| Espermidina | 10 mM. |
| 19.2 Solución Ditiotretitol (DTT). | |
| DTT | 100 mM. |
| 19.3 Solución de nucleótidos 5X. | |
| ATP | 2.5 mM. |
| CTP | 2.5 mM. |

| | |
|--|----------|
| GTP | 2.5 mM. |
| UTP | 2.5 mM. |
| 19.4 Radioisotopo para marcado de RNA. | |
| Uridina [α 32P], actividad especifica 600 mCi/m mol. | |
| 20.0 Soluciones para ensayos de retardamiento. | |
| 20.1 Solución BB 5X. | |
| HEPES | 0.5 mM. |
| Glicerol 80% | 50%. |
| KCl | 315 mM. |
| EDTA | 0.5 mM. |
| DTT | 10 mM. |
| MgCl ₂ | 40 mM. |
| Agregar 1.3 ul de espermidina 1M a cada alicuota de 150 ul. | |
| 20.2 Solución de tRNA. | |
| tRNA | 4 mg/ml. |

METODOS.

PREPARACION DE GELES DE AGAROSA Y AGAROSA BAJO PUNTO DE FUSION (LMP).

Después de sellar los extremos del molde de la cámara de electroforesis con cinta adhesiva y colocar el peine adecuado, se agregó la agarosa o agarosa LMP fundida en TBE 1X, a la concentración deseada; cubriendo del 30-50% del largo de los dientes del peine empleado. El amortiguador de corrida es TBE 0.5X. El voltaje para correr los geles es de 80-100 V, por un tiempo promedio de 30-60 minutos.

TINCION DE GELES DE AGAROSA.

Durante o después de la corrida (electroforesis) del gel de agarosa, se añaden 4-5 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml). Las bandas de DNA o RNA, se observan por irradiación con luz ultravioleta (onda larga) en el transiluminador.

RESTRICCION DE DNA.

Las restricciones de DNA (plásmidos) se llevaron a cabo siguiendo las especificaciones del amortiguador y las condiciones de temperatura y tiempo señalados por el proveedor de cada una de las enzimas.

Para eliminar RNA de las muestras, se agregó 1 μ l de RNasa A (2mg/ml) por 5 minutos a las mezclas de restricción.

LIGACION DE DNA (fragmento y vector de clonación).

La ligación de fragmentos de DNA, se llevó a cabo en un volumen de 10 μ l, empleando 1 μ l del amortiguador de ligación 10 X, 10 U de DNA ligasa T4 y aproximadamente 200 ng de DNA. La temperatura de ligación es de 16 °C por al menos 8 horas.

EXTRACCION DE FRAGMENTOS DE DNA DE AGAROSA BAJO PUNTO DE FUSION (LMP).

Una vez corrido el gel de agarosa y observados los fragmentos de interés, estos fueron recortados con una navaja y se colocaron en una cámara de electroforesis. Los fragmentos se cubrieron totalmente con LMP al 1%, al solidificar el gel, se corrió como se señaló anteriormente. Se recortaron las fragmentos de LMP (conteniendo las bandas de DNA), con una navaja y se colocaron en tubos eppendorff grandes. La LMP se fundió a 65-70 °C por 10 minutos. A la agarosa fundida se le añadieron 4 volúmenes de amortiguador TE 1X o agua bidestilada. Posteriormente se agregó 1 volumen (del volumen final) de fenol saturado con tris, los tubos se mezclaron fuertemente en el vortex, estos tubos se centrifugaron (microfuga para eppendorff) a la máxima velocidad por 15 minutos. La fase acuosa (superior) se pasó a otro tubo eppendorff y se le agregó un volumen de fenol-cloroformo 1:1, se mezcló suavemente en el vortex y se centrifugo en la microfuga, por 5 minutos. Se extrajo la fase acuosa nuevamente con un volumen igual de cloroformo, el sobrenadante se colocó en otro tubo y se le añadió un décimo del volumen de NaOAc 3M y dos volúmenes de etanol (100%) frío, se incubaron los tubos a -70 °C por 20 minutos. Después de éste tiempo los tubos se centrifugaron de 15-30 minutos a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y los tubos se secaron con vacío perfectamente. La pastilla se lavó con etanol frío al 70%. Los tubos se secaron nuevamente y la pastilla se resuspendió en TE 1X o agua bidestilada.

PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES.

En una caja petri con medio Psi-A, se sembró la bacteria E. coli

DH5 α . Esta caja se incubó toda la noche a 37 °C. Se tomó una asada de una sola colonia del paso anterior y se sembró en un matraz de 100 ml con 5 ml de medio Psi-B. El matraz se incubó a 37 °C hasta alcanzar una D.O de 0.3. El contenido de éste matraz se vació en un matraz de 1000 ml con 100 ml de medio Psi-B (medio precalentado a 37 °C); la bacteria se dejó crecer hasta alcanzar una D.O de 0.48. La D.O se lee en el espectrofotómetro a 550 nm. Al llegar la bacteria a 0.48, el matraz de cultivo se enfrió 5 minutos en hielo, después de éste tiempo se centrifugó a 6000 rpm 5 minutos a 4 °C, en centrifuga Sorvall (Sorvall SS 43). Las bacterias se resuspendieron en 40 ml de solución TFB 1 fría y se mantuvieron en hielo por 5 minutos, posteriormente se centrifugaron a 6000 rpm por 5 minutos a 4 °C, en centrifuga Sorvall. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en 4 ml de solución TFB 2 fría, con mucho cuidado (resuspender con pipeta) y se mantuvieron en el hielo por 15 minutos. Las bacterias se pusieron en alicuotas de 300 μ l en tubos eppendorff chicos, preenfriados en hielo seco. Estos tubos con células competentes, se almacenaron en nitrógeno líquido.

TRANSFORMACION DE CELULAS COMPETENTES.

Se descongelaron bacterias competentes en hielo y se les agregó 30 μ l de la solución β -mercaptoetanol (ver soluciones), manteniendo la mezcla en hielo por 10 minutos.

Se tomaron 50 μ l de la mezcla del paso anterior y se le agregó de 1-2 μ l del DNA muestra para transformar, se dejaron los tubos 30 minutos en el hielo.

Las bacterias se incubaron en baño María a 42 °C por 90 segundos, después se colocaron en hielo por 2 minutos. A los tubos

anteriores se les agregó 200 μ l de medio Psi-B, en campo estéril y se incubaron a 37 °C por una hora agitándose vigorosamente. Se puso todo el contenido de los tubos anteriores, en cajas petri con el medio y el antibiótico elegido; se espatularon las cajas en campo estéril y se incubaron toda la noche a 37 °C.

MINIPREPARACION DE DNA.

Se crecieron bacterias en 5 ml de medio Luria con el antibiótico elegido (bacteria con el plásmido deseado), se incubaron toda la noche a 37 °C en agitación. Las bacterias se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos (Sorvall SS 34). La pastilla de bacterias se resuspendió en 200 μ l de solución TS, en el vortex. Posteriormente se agregaron 200 μ l de solución ELT, agitando suavemente, estos tubos se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo los tubos se colocaron 15 minutos en baño María a 70 °C. Estos tubos se centrifugaron en microfuga de 15-30 minutos; se tomó el sobrenadante y se agregó un volumen igual de solución PEG 6000, se mezcló suavemente y se dejaron los tubos 20 minutos a temperatura ambiente. Estos tubos se centrifugaron 3-4 minutos, se eliminó el sobrenadante y se secaron perfectamente los tubos con vacío.

EXTRACCION DE DNA POR GRADIENTES DE CLORURO DE CESIO.

De un cultivo bacteriano de 250 ml crecido hasta una D.O de 0.8 y amplificado con cloranfenicol (125 μ g/ml) por 12 horas, se llevó a cabo la extracción de DNA por cloruro de cesio. Las bacterias se centrifugaron a 6000 rpm por 10 minutos. La pastilla de bacterias se resuspendió en 2 ml de solución TS. Se añadió a la mezcla 0.3 ml de la solución de lisozima (10 mg/ml) y se dejó en hielo por 5 minutos. A continuación se añadieron 4.5 ml de

solución de "Tritón juice", se mezcló por inversión y se mantuvo en hielo por 15 minutos. La mezcla altamente viscosa, se colocó con cuidado en tubos rígidos (polipropileno de 10 ml). Se centrifugó por 30 minutos a 30,000 rpm a 4 °C en el rotor 50 de titanio (50 Ti). Después de esta centrifugación, se desechó la pastilla y el sobrenadante se pasó a un tubo cónico graduado, para poder medir el volumen obtenido. Al sobrenadante se le añadió 0.95 gr de CsCl por mililitro. Se mezcló bien y se volvió a medir el volumen. Por último se añadió bromuro de etidio (200 µg/ml). Esta mezcla se colocó en tubos de polialómero para el rotor 50 Ti, estos tubos se equilibraron con aceite mineral. Los tubos se cerraron perfectamente y se centrifugaron a 45,000 rpm por al menos 36 horas a 45 °C (rotor 50 Ti, en ultracentrifuga). Transcurrido éste tiempo, se sacaron los tubos y se fijaron en un soporte donde se destaparon. La banda de DNA que corresponde al DNA superenrollado y que es el que se tomó, fue la banda inferior de las dos observadas, en la parte media del tubo. Con una aguja estéril, se pico el tubo y con la jeringa se succionó completamente la banda (en ocasiones la banda de DNA se ve a simple vista, en otros casos, es necesario usar una lámpara de luz U.V onda larga). El DNA se pasó a un tubo eppendorff limpio y se le añadió 1 volumen de isopropanol saturado con agua-sal, se mezcló fuertemente dejando que se separaran las dos fases. La fase acuosa (inferior), se mantuvo en el mismo tubo y solo se desechó el isopropanol (fase superior). El proceso se repitió hasta que la fase de isopropanol fue incolora. La fase acuosa, se colocó en una bolsa de diálisis (exclusión de 12-14,000 D) y se dializó contra 1 litro de solución TE 1X a 4 °C por

aproximadamente 12 horas. Finalmente el DNA se colocó en un tubo y se cuantificó en el espectrofotómetro, por medición de absorbancia a 260 nm.

TRANSCRIPCION "IN VITRO".

El DNA a ser transcrito "in vitro" , se cortó con la enzima de restricción adecuada. Una vez que el DNA ha sido cortado, se extrajo con fenol una vez, dos veces con cloroformo y por último se precipitó. A la mezcla de transcripción se le añadieron 3 μ l del DNA cortado (1 μ g), 6 μ l del amortiguador de transcripción 5X, 1 μ l de RNasin, 6 μ l de la mezcla de nucleótidos, 3 μ l de DTT 100 mM, 0.5 μ l de RNA-polimerasa adecuada y 10.5 μ l de agua-DEP. La reacción de transcripción se incubó por 1 hora a la temperatura específica de la RNA polimerasa (T7 a 37 °C y SP6 a 40 °C). Transcurrido éste tiempo, se tomaron 2-3 μ l de la mezcla de transcripción, se le agregaron 2 μ l de amortiguador de muestra y se corrió en un gel de agarosa al 1.8%, para verificar si la transcripción se llevó a cabo.

Nota: La transcripción radiactiva se llevó a cabo de igual manera a la transcripción sin marca, solo que se ponen 20 uCi de UTP [α 32P] y se reduce 10 veces la cantidad del mismo nucleótido frío (UTP).

PREPARACION DE GELES NATIVOS DE POLIACRILAMIDA AL 6%

Los geles al 6% de poliacrilamida, se prepararon entre dos placas de vidrio con separadores de 1-2 mm de espesor, en una cámara de electroforesis vertical. El gel se preparó mezclando las siguientes soluciones:

| | |
|---|--------|
| Acrilamida-bisacrilamida al 16% (stock) | 15 ml. |
| TBE 10X estéril | 2 ml. |

Se llevó a 40 ml con agua-DEP. A esta solución se le agregaron 200 μ l de persulfato de amonio 10% y 80 μ l de solución TEMED se mezcló y se vació entre las dos placas de vidrio con el peine adecuado. Se dejó polimerizar un tiempo razonable (15 minutos a temperatura ambiente).

MEZCLAS DE REACCION DE RETARDAMIENTO Y COMPETENCIA.

Los 11-12 μ l de reacción que contienen: 1 μ l de RNasin, 2 μ l de amortiguador de unión 5 X (BB 5X) con la concentración de sal deseada (KCl), 1 μ l de tRNA (4 μ g/ μ l), 1 μ l de extracto citoplásmico (ECI), 4 μ l de agua-DEP; se preincubaron 15 minutos a temperatura ambiente, después de este tiempo se agregó 1 μ l de RNA marcado con UTP [α 32P] y se incubó nuevamente 15 minutos a temperatura ambiente. Para los experimentos de competencia el RNA no marcado es agregado en la reacción antes de agregar la muestra marcada. Las muestras se cargaron en gel de poli(acrilamida-acrilamida 80:1), preparado en amortiguador TBE 0.5X y se corrió a corriente constante (15-20 mA) por 4-6 horas. Posteriormente los geles fueron secados, después estos se expusieron a una película de rayos X (Kodak-X-omat GBX-2) en cassette especial, por tiempo determinado a -20 °C.

PLAQUEO DE VIRUS.

A cajas de cultivo celular P-60 a una confluencia de 60-70%, se les eliminó el medio y se lavaron con 3-5 ml de solución PBS más 0.1% suero de caballo a 37 °C. A estas cajas se les agregaron 100 μ l de las diluciones virales preparadas previamente, las cajas se incubaron a 37 °C por 45 minutos, moviéndolas cada 15 minutos, para permitir una infección homogénea. Se retiró la dilución viral lo mejor que se pudo con micropipeta. Estas cajas se

cubrieron con 5 ml de la solución: DEM 1X más 1X de antibióticos y 0.9% de bacto-agar; la mezcla a la temperatura de 45 °C, se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente (10-15 minutos) y las cajas se incubaron a 37 °C por tres días. Transcurrido éste tiempo, a cada una de las cajas se les añadió 2 ml de TCA al 10% y se dejaron a temperatura ambiente 10 minutos. Enseguida se eliminó el TCA y el agar con una espátula. Posteriormente a las cajas se les añadieron 3 ml de solución cristal violeta, las cajas se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente. Por último las cajas se lavaron con agua, se escurrieron y se contaron las placas de lisis, para obtener el título del virus (UFP). Las diluciones virales, en solución PBS 1% suero de caballo fueron:

10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-10} .

CULTIVO DE CELULAS HeLa.

En caja petri estéril con 10 ml de medio DEM, con 10% de suero de caballo y antibiótico, se sembraron las células HeLa en campo estéril (campana de flujo laminar), se incubaron a 37 °C, con flujo de CO₂. Las cajas se usaron a la confluencia deseada.

OBTENCION DE LA RNT 5' (silvestre y mutadas).

Una construcción es igual para la cepa silvestre y mutada en una base (472), estas RNT 5' completas están insertadas en el sitio BamHI-BamHI, de un plásmido que tiene el promotor T7. La construcción para la cepa mutada en dos bases (472 y 482), la RNT 5' completa esta insertada en el sitio HindIII-HindIII, de un plásmido que tiene el promotor de SV-40.

Las RNT 5' de las tres cepas virales, fueron extraídas, por la restricción del DNA, con la enzima adecuada (ver arriba). La mezcla de restricción se colocó en un gel de agarosa al 1%, se

corrió y se tiñó para observar el fragmento (745 pb aproximadamente) esperado, por comparación con las bandas del marcador de los fagos Lambda cortado con HindIII o ϕ X-174 cortado con HaeIII, cargado en el mismo gel.

CLONACION MOLECULAR DEL SEGMENTOS 276-672 EN EL VECTOR pGEM-4Z.

Las RNT 5' de la cepa silvestre y mutadas se cortaron con la enzima TaqI. La muestra de la restricción se colocó en un gel de agarosa al 1.8%, la banda esperada fue de 400 pb aproximadamente. Este segmento de (400 pb) se recorto y se colocó en un gel de agarosa LMP, para poder extraer la banda como se apunto antes.

El vector de clonación pGEM-4Z se corto con las enzimas AccI/BamHI, en éste sitio se introdujo el segmento (400pb), de la cepa virulenta y mutada en una base (472); las ligaciones fueron por separado; AccI/BamHI crearon en el vector, extremos compatibles, para el segmento TaqI-BamHI. El vector pGEM-4Z para la cepa viral mutada en dos bases (472 y 482), se cortó con las enzimas AccI/HindIII, en éste sitio se introdujo el segmento de la RNT 5' de esta cepa, la restricción AccI/HindIII creo en el vector, extremos compatibles para el segmento TaqI-HindIII. Con estas mezclas de ligación se transformaron bacterias competentes, para clonar el plásmido construido.

RESULTADOS.

A través del tiempo y gracias a los esfuerzos de gran número de investigadores a nivel mundial, ha quedado claro que la región no traducida 5' (RNT 5') del RNA del virus de la poliomielitis (750 b), tiene secuencias necesarias en traducción, replicación y atenuación viral (38, 60, 61, 70). Esta región presenta una estructura secundaria altamente compleja y conservada entre los Picornavirus (22, 39, 58, 69, 96, 98).

Los genomas de los tres serotipos P1/MAHONEY, P2/LANSING y P3/LEON contienen secuencias altamente homólogas (509-639 b) y secuencias altamente variables (640-742 b) en la RNT 5' (69, 96, 98). Se sabe que deleciones o modificaciones dentro de ella, tienen efectos significativos sobre la eficiencia de traducción. También se sabe que la secuencia 140-630, es esencial para la unión activa de ribosomas y para la traducción del RNAm sin "Cap" (92, 99).

Recientemente se ha demostrado que polipéptidos celulares, interactúan con la RNT 5' viral y se sugiere que algunas partes de la RNT 5', se unen con ciertos componentes de la maquinaria celular, tales como factores de iniciación de traducción (eIF-2, eIF-2B o sus complejos) y/o ribosomas, que sintetizan las proteínas (15, 95). La predicción en computadora de los modelos de estructura secundaria de la RNT 5', sugieren que la mutación en la posición 472 en la cepa vacunal P3/SABIN, puede producir un cambio en la estructura secundaria de la molécula. Se sabe que tal mutación puede causar el efecto dual de deficiencia en traducción del RNAm viral y atenuación de la virulencia (22, 69, 96, 98).

Salvo las consecuencias biológicas de las mutaciones que causan reducción en la neurovirulencia (472 en la cepa SABIN y 480 en la cepa MAHONEY) y disminución de la eficiencia de iniciación "in vitro" de la síntesis de proteínas virales, poco se sabe del efecto a nivel molecular de las mutaciones atenuantes dentro de la RNT 5' viral.

Por las evidencias aquí expuestas, decidimos determinar si la región específica 276-620 b, de la RNT 5' viral de las cepas LEON, SABIN y SFP8 son reconocidas por proteínas celulares. Las cepas mutantes elegidas fueron P3/SABIN, mutada en la base 472 ampliamente caracterizada (mutante natural) y la cepa P3/SFP8, mutada en la base 472 y 482 construida por V.R. Racaniello (creada por mutagénesis dirigida). Las características que presenta esta doble mutante SFP8 son: placas pequeñas, deficiencia en traducción y replicación a 38.5 °C, forma placas normales a 32 °C; ésta cepa SFP8 es atenuada en ratones, tiene una D.I 50 de $1-5 \times 10^8$; es deficiente en traducción en cultivos de células HeLa y células de neuroblastoma de ratón. El cambio puntual en la base 482 es de G por A; la cepa SFP8 presenta en general un fenotipo más atenuado que la cepa SABIN.

El segmento comprendido entre las bases 276-620 del RNA (TaqI-BalI) se localiza dentro de la región homóloga y altamente conservada en los tres serotipos virales; dentro de esta misma región se ubican las mutaciones de las cepas seleccionadas y en esta misma zona se logró determinar la interacción RNA-proteína (15, 69, 96).

CONSTRUCCION DE PLASMIDOS RECOMBINANTES pGEM-LEON Y pGEM-SABIN.

Para obtener los fragmentos de DNAC 276-620 pb, de la RNT 5'

deseados de estas dos cepas virales LEON (silvestre) y SABIN (mutada en la base 472) se siguió la estrategia esquematizada en la figura 8. Como primer paso se obtuvo la RNT 5' de las cepas virales, de los plásmidos pVN-27CAT (cepa silvestre) y pVN-28CAT (cepa SABIN), construidos por R.M Del Angel. La RNT 5' completa (672 b) fue extraída de pVN-27CAT y pVN-28CAT, restringiéndolos con la enzima BamHI, esta enzima liberó la RNT 5', como un fragmento BamHI-BamHI de aproximadamente 672 pb (ver mat. met). Este fragmento posteriormente, fue extraído de agarosa bajo punto de fusión (ver mat. met). El fragmento BamHI-BamHI una vez precipitado, se sometió a una segunda restricción con la enzima TaqI que cortó en la base 250 y 276, de la RNT 5' en ambas cepas virales (ver mat. met). El fragmento de interés presentó un tamaño de aproximadamente 400 pb (276-672 b). Los fragmentos obtenidos con TaqI, se analizaron en un gel de agarosa al 1.8%, para poder separar claramente fragmentos de bajo peso molecular; se tomó el fragmento de 400 pb y se extrajo de agarosa bajo punto de fusión.

Obtenidos los fragmentos de 400 pb de las RNT 5' virales, se introdujeron en el vector de clonación pGEM-4Z. El vector de clonación fue restringido previamente con las enzimas AccI y BamHI, las cuales cortaron en la región de sitios múltiples de clonación, dentro del gene de Lac-Z. El extremo AccI del vector fue compatible con el extremo TaqI del fragmento de la RNT 5', por lo cual la inserción de los fragmentos se realizó de una forma dirigida; por esta razón no hubo necesidad de determinar la orientación de los fragmentos de la RNT 5', clonados dentro del vector pGEM-4Z.

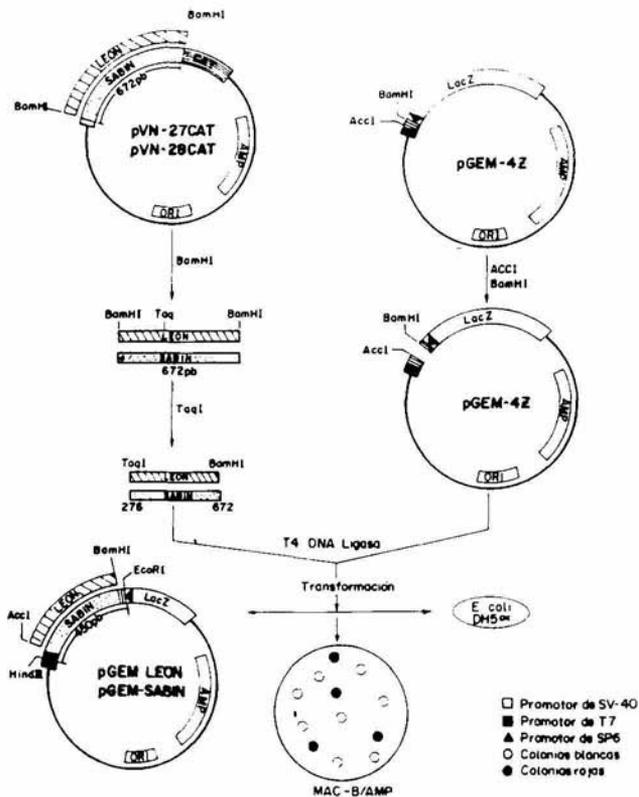


Figura 8. Estrategia de construcción de los plásmidos recombinantes pGEM-LEON y pGEM-SABIN.

La RNT 5' LEON y SABIN completa (672 b), se extrajo de los plásmidos pVN-27CAT y pVN-28CAT respectivamente con la enzima BamHI. Estos DNAC se restringieron con TaqI, para obtener los fragmentos que van del nucleótido 276-672. Vector pGEM-4Z se linearizó con las enzimas AccI y BamHI. Los fragmentos de las RNT 5' se ligaron por separado al vector pGEM-4Z.

El vector pGEM-4Z se seleccionó para la clonación de las RNT 5' por las siguientes características: a) contiene los promotores de los bacteriófagos T7 y SP6 en forma encontrada y, entre éstos, una zona de sitios múltiples de clonación, lo cual permite usar diversas enzimas de restricción, para insertar fragmentos de DNAC deseados; b) posee el gene de resistencia al antibiótico ampicilina y c) expresa el péptido α del gene Lac-Z, por lo tanto al insertar fragmentos de DNA en el sitio múltiple de clonación, se inactiva el gene de Lac-Z, lo cual confiere un marcador extra de selección. La cepa bacteriana E. coli DH5 α fue seleccionada por su gran eficiencia de transformación y por carecer del gene de Lac-Z.

Los fragmentos de la RNT 5' LEON y SABIN, se ligaron con el vector pGEM-4Z, cortado con las enzimas AccI y BamHI en presencia de la T4 DNA-ligasa (ver mat. met). Con estas mezclas de ligación se transformaron bacterias E. coli DH5 α , las cuales se espatularon en cajas petri con el medio selectivo Mac-B/ampicilina. En estas cajas crecieron colonias bacterianas blancas (que no metabolizan lactosa) por carecer del gene Lac-Z y colonias rojas (que metabolizan lactosa), ambas resistentes a la ampicilina. Al tener los dos plásmidos construidos y clonados, procedimos a extraer el DNA (plásmidico) de las bacterias blancas por minipreparación de DNA.

CONSTRUCCION DEL PLASMIDO RECOMBINANTE pGEM-SFP8.

Para obtener el fragmento de DNAC conteniendo la región 276-680 pb de la RNT 5' de la cepa viral SFP8, se siguió la estrategia esquematizada en la figura 9. Como primer paso se obtuvo la RNT 5' viral, del plásmido pGC-SFP8CAT (cepa SFP8), construido por

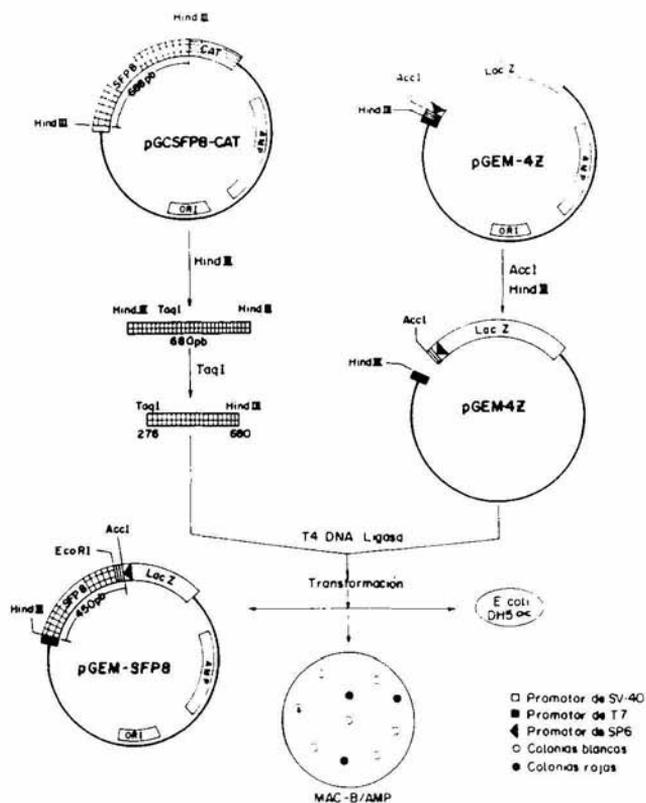


Figura 9. Estrategia de construcción del plásmido recombinante pGEM-SFP8.

La RNT 5' completa (680 b) se extrajo del plásmido pGC-SFP8CAT con la enzima HindIII. Este DNac se restringió con TaqI, para obtener el fragmento que va del nucleótido 276 al 680. Vector pGEM-4Z se linealizó con las enzimas AccI y HindIII. El fragmento de la RNT 5' se ligó a pGEM-4Z.

R.M Del Angel. La RNT 5' completa (680 b) fue extraída de pGC-SFP8CAT, restringiendolo con la enzima HindIII, esta enzima liberó la RNT 5' como un fragmento HindIII-HindIII, de aproximadamente 680 pb, éste fragmento posteriormente fue extraído de agarosa bajo punto de fusión. El fragmento HindIII-HindIII una vez precipitado se sometió a una segunda restricción con la enzima TaqI, que cortó en las bases 250 y 276 de la RNT 5'. El fragmento de interés presentó un tamaño de aproximadamente 415 pb. El fragmento obtenido con TaqI se analizó en un gel de agarosa al 1.8%, para poder separar claramente fragmentos de bajo peso molecular, obteniendose el fragmento de 415 pb, que se extrajo de agarosa bajo punto de fusión. Este fragmento de la RNT 5' (TaqI-HindIII) se introdujo en el vector de clonación pGEM-4Z. El vector pGEM-4Z fue restringido con las enzimas AccI y HindIII, las cuales cortaron en la región de sitios múltiples de clonación dentro del gene de Lac-Z. Como en el caso anterior el extremo AccI fue compatible con el extremo TaqI de la RNT 5', por lo cual la inserción del fragmento de la RNT 5' se realizó de una forma dirigida. El fragmento de DNAC de la RNT 5' SFP8, se ligó al vector pGEM-4Z cortado con las enzimas AccI y HindIII, en presencia de la enzima DNA-ligasa del fago T4. Con esta mezcla de ligación se transformaron bacterias E. coli DH5 α , que se espatularon en cajas petri con el medio selectivo Mac-B/ampicilina; se tomaron colonias blancas de las cuales se extrajo el DNA.

ANALISIS DE RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES pGEM-LEON, pGEM-SABIN Y pGEM-SFP8.

En la figura 10 se muestran los mapas de los plásmidos y las

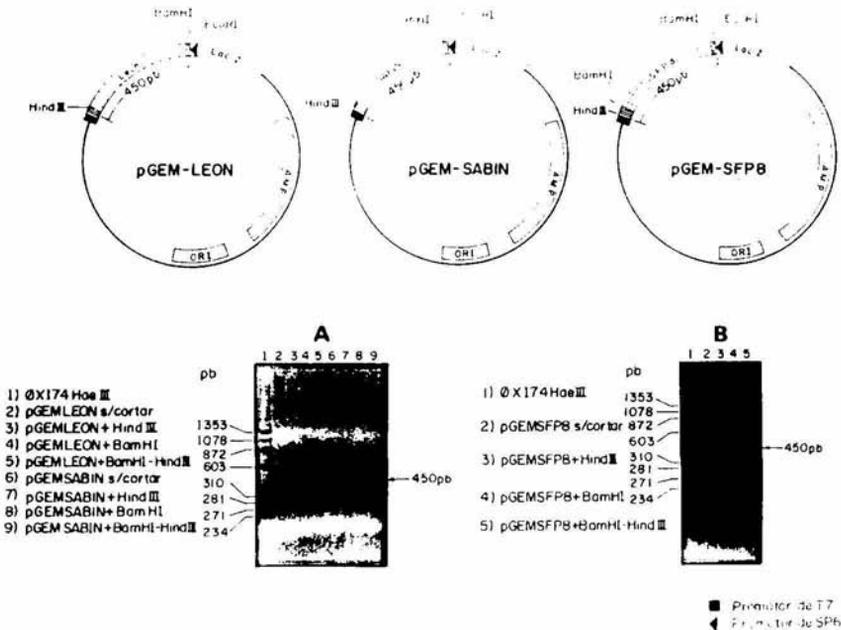


Figura 10. Mapas genéticos y análisis enzimático (HindIII y BamHI), de los plásmidos pGEM-LEON, pGEM-SABIN y pGEM-SFP8. Los plásmidos pGEM-LEON (carril 3 y 4), pGEM-SABIN (carril 7 y 8) gel A y pGEM-SFP8 (carril 3) gel B, restringidos con las enzimas HindIII y BamHI respectivamente se linearizaron. La doble restricción con las enzimas HindIII-BamHI, generaron un fragmento de aproximadamente 450 pb en pGEM-LEON (carril 5), pGEM-SABIN (carril 9) gel A y pGEM-SFP8 (carril 5) gel B. El plásmido pGEM-SFP8 cortado con BamHI, liberó el fragmento de 450 pb (carril 4), por la regeneración de un sitio BamHI. Marcador de peso molecular se usó DNA del fago ØX-174 cortado con la enzima HaeIII (carril 1) gel A y B, cuyos tamaños de fragmento se indican a la izquierda de los gels de agarosa al 1.8%. Carriles 2 y 6 gel A y carril 2 gel B muestran plásmidos sin cortar.

fotografías de los geles de agarosa al 1.8%, que muestran el patrón de restricción de los plásmidos pGEM. Por el análisis de restricción enzimática se observó que las enzimas HindIII y BamHI cortaron en los sitios únicos, dentro de la zona múltiple de clonación del vector pGEM-4Z, razón por la cual los plásmidos restringidos con estas enzimas fueron linearizados (carril 3, 4, 7 y 8 gel A; carril 2 gel B). La doble restricción con HindIII-BamHI liberó el fragmento de 450 pb, compuesto por el fragmento de la RNT 5' (397 pb en las cepas LEON y SABIN y 415 pb en la cepa SFP8) y los enlazadores o "linkers" flanqueantes del vector de clonación (carril 5 y 9 gel A; carril 5 gel B). La producción del fragmento de 450 pb de pGEM-SFP8 restringido con BamHI, resultó gracias a que se regeneró un sitio BamHI extra, al insertar el fragmento de DNAC de la RNT 5' dentro de pGEM-4Z (carril 4 gel B).

Los tamaños aproximados de los fragmentos generados de los tres plásmidos, se compararon con los fragmentos de DNA del fago ϕ X-174 (cortado con la enzima HaeIII), usados como marcadores de peso molecular, (carril 1 gel A y B). Los sitios de corte de las enzimas empleadas y el fragmento de la RNT 5' de las cepas virales, son esquematizados en los mapas genéticos en la misma figura.

Después de haber construido los tres plásmidos recombinantes, con los fragmentos de las RNT 5' virales en la dirección correcta y, posterior a su purificación en gradientes de cloruro de cesio, procedimos a restringir (linearizar) los plásmidos con las enzimas BamHI y BalI, que cortaron en el extremo y dentro de la RNT 5' de pGEM-LEON, pGEM-SABIN y pGEM-SFP8. Solamente los DNAC

que fueron restringidos con *BalI* se emplearon en la transcripción "in vitro", en presencia y en ausencia de UTP [α 32P] (ver mat. met).

RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA DE pGEM-LEON, pGEM-SABIN Y pGEM-SFP8 CON LAS ENZIMAS *BamHI* Y *BalI*.

La figura 11 muestra los mapas genéticos y la fotografía del gel de agarosa al 1.0%. El análisis de restricción mostró que los plásmidos fueron linealizados con las enzimas *BamHI* y *BalI* (carril 3, 4, 6, 7 y 10). Como se mencionó, la restricción del plásmido pGEM-SFP8 con *BamHI*, liberó el fragmento de 450 pb de la RNT 5' (carril 9). En algunas muestras se observa una banda (superior) que corresponde a DNA no cortado (carril 4, 7 y 10). En estos mapas también se indica la dirección de la transcripción del RNA, en donde los plásmidos pGEM-LEON y pGEM-SABIN inician la transcripción con el promotor de T7 y pGEM-SFP8 con el promotor de SP6.

Los tamaños aproximados de los fragmentos (plásmidos lineales) se compararon, con los fragmentos del marcador de peso molecular del fago Lambda cortado con la enzima *HindIII* (carril 1).

Los plásmidos cortados con la enzima *BalI* se extrajeron con fenol y se precipitaron, para realizar paralelamente la transcripción de los RNA truncados. Se llevó a cabo también la transcripción en ausencia de UTP [α 32 P], con el propósito de comparar la eficiencia de la transcripción de las sondas radioactivas, de los RNAv (276-620 b) y para los ensayos de competencia.

Para determinar si las regiones específicas del RNA 276-620 (*TaqI*-*BalI*) de las RNT 5', son reconocidas por proteínas celulares, los RNA marcados (ver mat. met.) fueron incubados "in

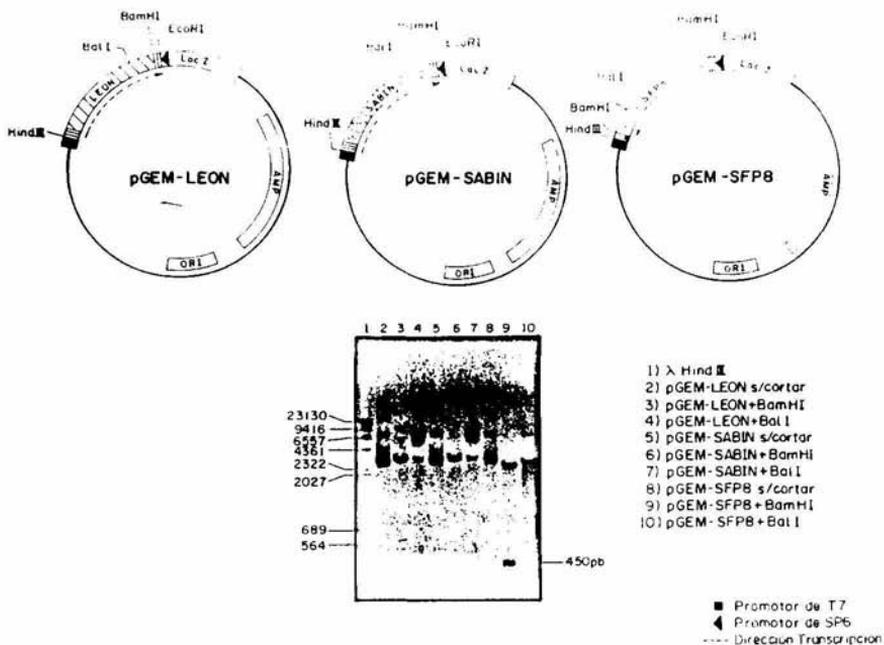


Figura 11. Mapas genéticos y restricción enzimática (BamHI y BclI) de los plásmidos pGEM-LEON, pGEM-SABIN y pGEM-SFP8.

Los plásmidos pGEM-LEON (carril 3 y 4), pGEM-SABIN (carril 6 y 7) y pGEM-SFP8 (carril 10) cortados con las enzimas BamHI y BclI linealizaron los plásmidos. La enzima BamHI generó un fragmento de 450 pb en pGEM-SFP8 (carril 9), dado que se regeneró un sitio BamHI. Marcador de peso molecular se usó DNA del fago Lambda cortado con la enzima HindIII, cuyos tamaños de fragmento se indican a la izquierda del gel de agarosa al 1.0% (carril 1). Carriles 2, 5 y 8 muestran plásmidos sin cortar.

vitro" con un extracto citoplasmático, obtenido de células HeLa infectadas (ECI). La formación de los cRNPs se analizó por electroforesis en geles nativos de poliacrilamida.

Este sistema se seleccionó para el análisis de complejos RNA-proteína, dado que los geles nativos no alteran la estructura secundaria de DNA o RNA y tampoco alteran la formación de cRNPs.

FORMACION DEL COMPLEJO RNA-PROTEINA CON EL RNA 276-620 b DE LA RNT 5' LEON, SABIN Y SFP8.

La figura 12 muestra la autorradiografía del gel de poliacrilamida al 6%, con los RNA de las RNT 5' de las cepas virales. Estos resultados mostraron una clara diferencia en la migración del RNA libre (-) de las RNT 5', de la cepa viral SFP8 con respecto a las cepas virales LEON y SABIN; por otro lado también se pudo observar, que los tres tipos de RNA fueron capaces de asociarse a proteínas celulares (+). Los cRNPs formados presentaron el mismo comportamiento de movilidad.

EFFECTO DE LA CONCENTRACION MOLAR DE KCl SOBRE LA FORMACION DEL COMPLEJO RNA-PROTEINA.

Por los resultados obtenidos del primer ensayo de retardamiento y dado que no pudimos observar ninguna diferencia en la migración de los cRNPs, formados con la RNT 5' de las tres cepas virales, decidimos analizar el efecto de diferentes concentraciones iónicas de KCl sobre la formación del cRNP.

En la figura 13 se muestran las autorradiografías de los geles nativos, donde se analizó la región de 276 a 620 b de las cepas virales LEON, SABIN y SFP8 a diferentes concentraciones de sal.

En estos ensayos se observó que la concentración de 60mM (baja)

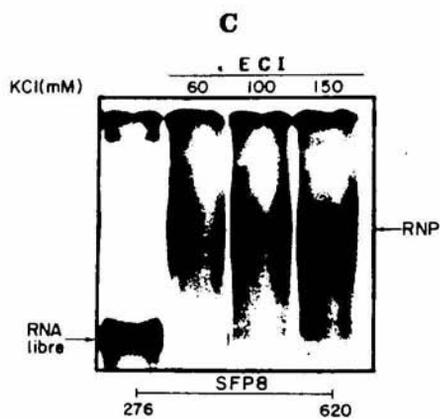
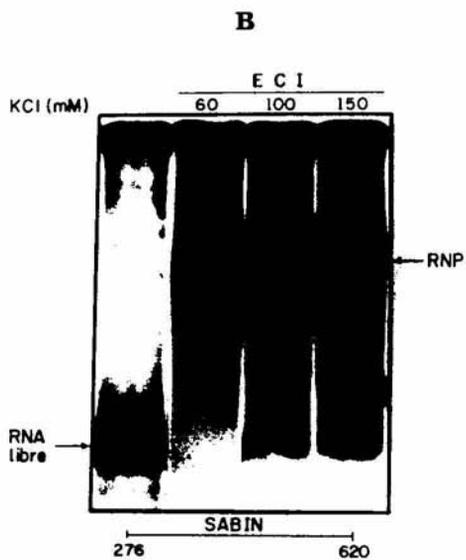
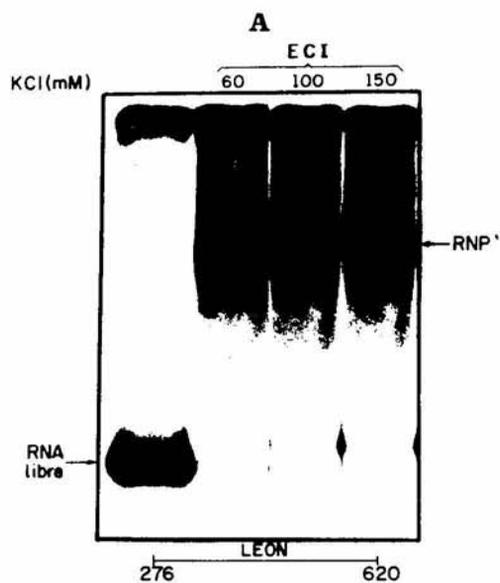


Figura 12. Gel de retardamiento del RNA de la RNT 5' (276-620 b) de las cepas virales LEON, SABIN y SFP8.

El RNA marcado con UTP [α 32 P] se incubó en presencia (+) o ausencia (-) de ECI (4 μ g). Tanto el RNA libre como los cRNPs estan indicados en la figura.

Figura 13. Efecto de la concentración molar de sal (KCl), en la unión de proteínas celulares al RNA de la RNT 5' (276-620 b), de las cepas virales LEON, SABIN y SFP8.

El RNA marcado con UTP [α 32P] de las cepas LEON, SABIN y SFP8 fueron incubados en ausencia de ECI (primer carril en A, B y C). El mismo segmento de los tres RNAv fue incubado en presencia de ECI (4 μ g) (tres últimos carriles en A, B y C).



de KCl altera muy poco la formación del cRNP, en las cepas SABIN y SFP8 (figura 13 paneles B y C). Por otro lado a las concentraciones de 100mM (media) y 150mM (alta) de KCl, se observó el efecto de la sal sobre la formación del cRNP, en las dos cepas mutantes SABIN y SFP8, dado que parte del cRNP se disoció.

Es interesante hacer notar, que con la cepa silvestre no se alteró la formación del cRNP a la concentración máxima de sal empleada (150mM KCl) figura 13 panel A.

Con el fin de comparar la alteración en la formación del cRNP, a las concentraciones de 100 y 150mM de KCl, entre las tres cepas virales y para descartar posibles alteraciones presentes en los ensayos anteriores, realizamos el ensayo de retardamiento en un mismo gel, bajo las mismas condiciones de incubación y electroforesis (figura 14). Dado que no se observó modificación a la concentración baja de 60 mM de KCl (figura 13 panel B y C), esta concentración no fue incluida en este nuevo gel.

Como en los casos anteriores se observó de manera reproducible (figura 14) que los cRNP, de las cepas SABIN y SFP8, fueron alterados cualitativamente en su definición de la formación del cRNP, ya que se observó un barrido extenso del cRNP hasta la región de migración del RNA libre, a las concentraciones de media y alta sal (figura 14 carril 4, 5, 7 y 8). La formación definida del cRNP nuevamente, no fue alterada a la máxima concentración de sal empleada, para el RNA de la RNT 5' de la cepa LEON (figura 14 carril 2). Estos resultados sugieren diferencias, en el comportamiento de los cRNPs formados con las diferentes RNT 5'.

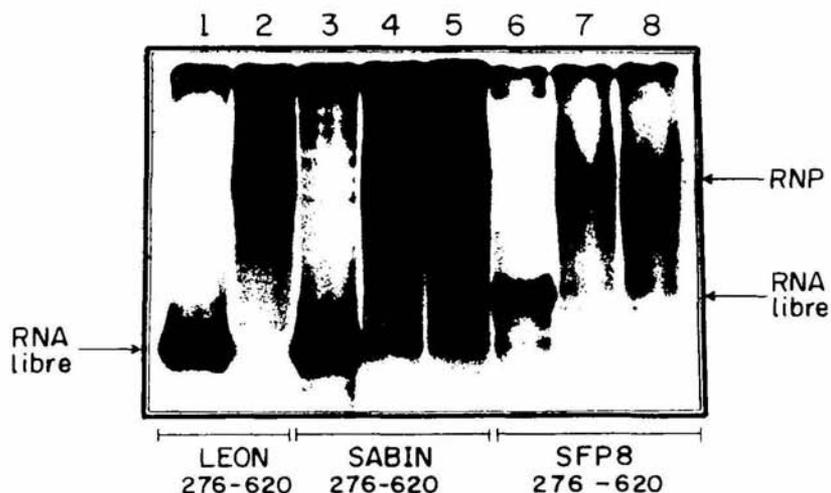


Figura 14. Efecto de la concentración de KCl, en la unión de proteínas celulares al RNA de la RNT 5' (276-620 b) de las cepas virales LEON, SABIN y SFP8.

El RNA marcado con UTP [α 32P] se incubó en ausencia (carril 1, 3 y 6) y en presencia de ECI (4 μ g) (carril 2, 4, 5, 7 y 8). La resistencia a sal del cRNP, se observó por la incubación con 100mM (carril 4 y 7) y 150mM de KCl (carril 2, 5 y 8) respectivamente. Tanto los RNA libres como los cRNPs se señalan en la figura.

ESPECIFICIDAD DE FORMACION DE COMPLEJO RNA-PROTEINA.

Al observar unión de proteínas celulares al RNA de las RNT 5', de las tres cepas virales (figura 12) y que la fuerza de interacción es diferente en cada cepa (figura 13 y 14), decidimos analizar la especificidad en la unión de proteínas celulares al RNAv y además determinar si las proteínas que se unen a la cepa silvestre, son las mismas que se unen a las cepas mutantes empleando ensayos de competencia.

La figura 15 muestra las autorradiografías de los geles nativos, cargados con el RNA que comprende la región 276-620 b, de la RNT 5' de las cepas LEON, SABIN y SFP8 de poliovirus.

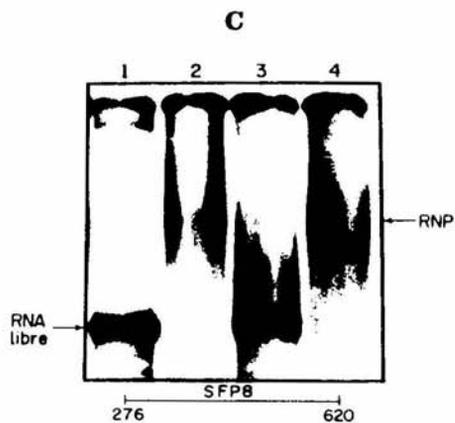
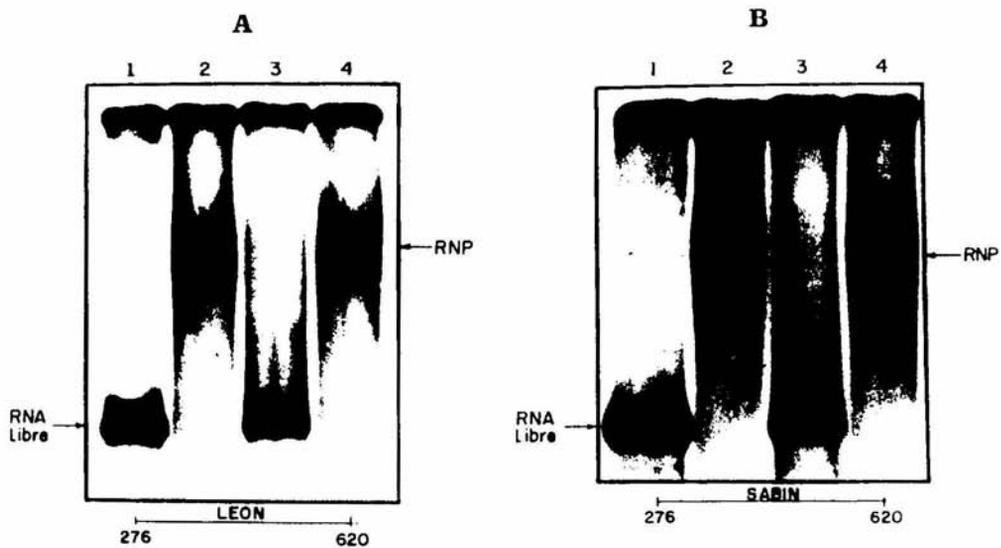
En el carril 1 de los geles, se muestran los RNA en ausencia de ECI señalado como RNA libre. En el carril 2, 3 y 4 se muestran los cRNPs formados en presencia de ECI, donde se pudo observar que la interacción RNA-proteína, es específica para el RNAv, ya que el complejo desapareció cuando se añadió un exceso de 50X, del RNA 276-620 b de la cepa LEON sin marcar (carril 3 panel A, B y C) y no con un exceso de 50X del RNA antisentido del gene de CAT sin marcar (carril 4, panel A, B y C).

En éstos ensayos se obtuvo competencia total del RNA LEON 276-620 b (sin marcar) con los RNAs de las tres cepas, LEON, SABIN, y SFP8, apoyando la idea de que las proteínas que interaccionan con la cepa LEON, son las mismas que interactúan con las cepas mutantes.

Un exceso de RNA homólogo sin marcar, evita la formación de cRNPs entre el RNA marcado y las proteínas del ECI y no un exceso del RNA antisentido del gene de CAT, permitiendonos también hablar de una interacción específica.

Figura 15. Ensayo de competencia del RNA de la RNT 5' (276-620) de las cepas virales LEON, SABIN y SFP8.

Los RNA (276-620 b) marcados con UTP [α 32P] de las cepas LEON, SABIN y SFP8 fueron incubados con ECI (4 μ g) (carril 2, 3 y 4,) o en ausencia de ECI (carril 1) paneles A, B y C. Los RNA fueron competidos con un exceso de 50X del mismo RNA 276-620 b, de la cepa LEON sin marcar (carril 3 A, B y C) y con exceso de 50X, del RNA antisentido del gene de CAT (carril 4 A, B y C) sin marcar. Tanto el RNA libre como los cRNPs se señalan en la figura.



Del amplio trabajo que se realiza sobre el virus de la poliomielitis, la tendencia actual radica en el estudio de la RNT 5', ya que en esta región se localizan funciones regulatorias del virus; una de las cuestiones más importantes y sobresalientes de elucidar, es la posible estructura secundaria de esta región regulatoria. Esto representa un paso clave para entender los mecanismos en los que radica su funcionalidad, con el fin de encontrar vías por las cuales controlar sus diferentes funciones. En la actualidad existen cuatro modelos propuestos para la estructura secundaria del RNA de la RNT 5' viral. Estos modelos comparten algunas características y algunas otras que impiden el compararlos, con el fin de obtener un modelo concenso para la estructura del RNA de la RNT 5' viral (22, 69, 96, 98).

Un modelo recientemente propuesto por el grupo de Agol V.I. y colaboradores (96), basado en análisis computacional, consideraciones evolutivas, aspectos termodinámicos y experimentos bioquímicos y biológicos propone la existencia de tres dominios (I, II y III), dentro de la región central de la RNT 5' viral (236-628 b). Estos dominios contienen elementos conservados en la estructura primaria y secundaria, los cuales parecen estar involucrados en el control de la traducción del RNAm y en la neurovirulencia (96).

Los resultados de varios laboratorios sobre la RNT 5', sugieren fuertemente que algunos segmentos genómicos, que corresponden a los dominios I y II, están involucrados en la iniciación independiente del "Cap". Con respecto al dominio III Agol V.I y colaboradores (96), han encontrado que virus con deleciones de los nucleótidos 564 a 727 (dominio III), retienen su capacidad

para crecer en cultivos de tejidos celulares. Esta evidencia sugiere la dispensabilidad del dominio III, en la eficiente iniciación de la traducción. Sin embargo, algunas evidencias que contradicen la observación arriba expuesta para el tercer dominio viral son: a) una mutación en el séptimo codon AUG (A por U) en la posición 588, resulta en virus que tienen un fenotipo de placas pequeñas y deficiencia en traducción (97). En esta región se localiza parte del segmento 320 a 631 b de unión interna de ribosomas, que es capaz de formar un complejo específico de RNA-proteína con un factor celular de 52 KD (95); b) se ha detectado la formación de cRNPs entre proteínas celulares y el segmento 510 a 629 b del RNA de la RNT 5', además este mismo segmento se protege de la degradación química, por el método de "Footprinting" (mapa de huellas) (15); c), las deleciones 556-729 b causan variantes de placas pequeñas y la infectividad es perdida con la deleción 551 a 729 b.

CONSTRUCCION DEL PLASMIDO RECOMBINANTE pGEM-LEON222.

Por los datos aquí mostrados de la participación del dominio III de la RNT 5', decidimos analizar el papel de éste dominio en la interacción RNA-proteína, por análisis de retardamiento y competencia en geles nativos de poliacrilamida.

El fragmento de DNAC 488-672 pb (PvuII-BamHI) de la RNT 5' de la cepa LEON, se obtuvo como se indica en la figura 16. Como primer paso se obtuvo la RNT 5' completa (672 pb), del plásmido pVN-27CAT. La RNT 5' completa se extrajo de pVN-27CAT, restringiéndolo con la enzima BamHI; esta enzima liberó la RNT 5', como un fragmento BamHI-BamHI (672 pb), éste fragmento se extrajo de agarosa bajo punto de fusión. El fragmento BamHI-BamHI

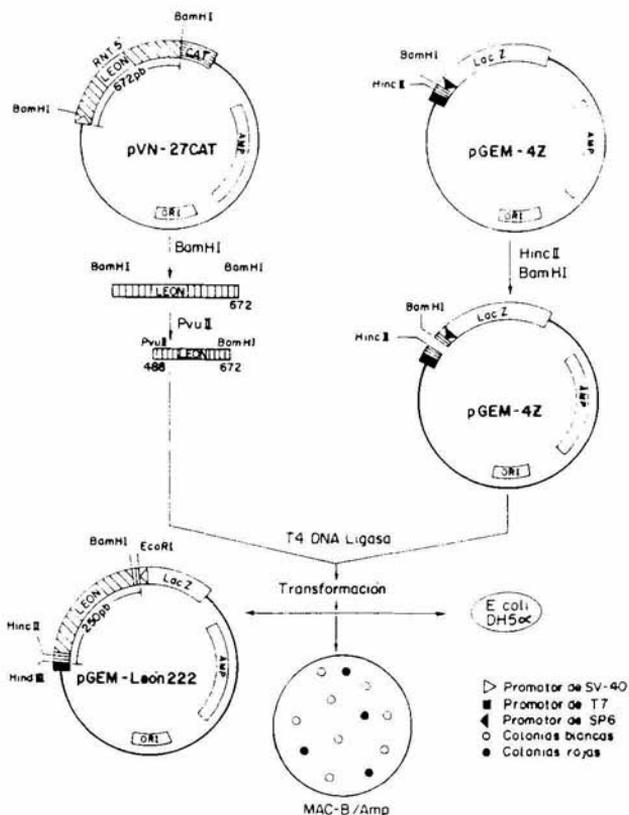


Figura 16. Estrategia de construcción del plásmido recombinante pGEM-LEON222.

La RNT 5' completa de la cepa LEON (672 pb), se extrajo del plásmido pVN-27CAT con la enzima BamHI; este DNAC se restringió con la enzima PvuII, para obtener el fragmento 488-672 pb. Vector de clonación pGEM-4Z, se linearizó con las enzimas HincII y BamHI. El fragmento RNT 5' 488-672 pb LEON se ligó al vector pGEM-4Z.

una vez precipitado, se sometió a una segunda restricción con la enzima PvuII, que cortó en la base 488 de la RNT 5'. El fragmento de interés presentó un tamaño de aproximadamente 184 pb y abarcó del nucleótido 488 al 672. El fragmento de 184 pb se extrajo de agarosa bajo punto de fusión.

Obtenido el fragmento PvuII-BamHI de la RNT 5', se introdujo en el vector de clonación pGEM-4Z. El vector previamente fue cortado con las enzimas HincII y BamHI, las cuales cortaron en la zona de sitios múltiples de clonación dentro del gene de Lac-Z. El extremo HincII del vector es compatible con el extremo PvuII del fragmento de la RNT 5', por lo cual la inserción del fragmento se realizó de una forma dirigida; gracias a esto, no hubo necesidad de determinar la orientación del fragmento de la RNT 5', clonado dentro del vector. El fragmento de DNAC de la RNT 5' LEON, se ligó con el vector pGEM-4Z en presencia de la ligasa del fago T4. Con esta mezcla de ligación se transformaron bacterias E. coli DH5 α , las cuales se espatularon en cajas petri con el medio selectivo Mac-B/ampicilina.

Al tener el plásmido construido y clonado, procedimos a extraer el DNA plasmidico, para analizarlo por restricción enzimática.

ANALISIS DE RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA DEL PLÁSMIDO pGEM-LEON222.

La figura 17 muestra los mapas del plásmido y la fotografía del gel de agarosa al 1.8%, que muestra el patrón de restricción. Las enzimas de restricción HindIII y BamHI cortaron en los sitios únicos dentro de la zona de sitios múltiples de clonación del vector pGEM-4Z, por lo cual los plásmidos restringidos con estas enzimas fueron linearizados (carril 3, 4 y 7). La enzima BalI cortó dentro del sitio único del fragmento de la RNT 5'

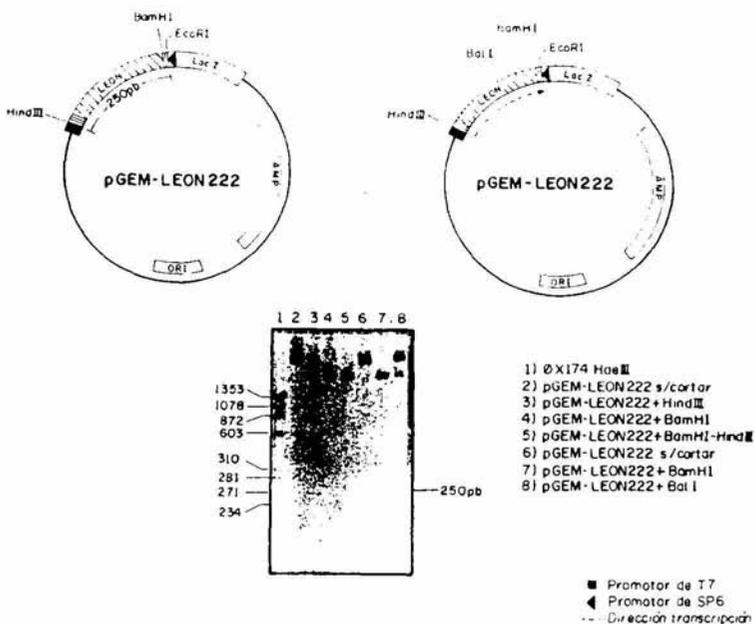


Figura 17. Mapas genéticos y análisis enzimático del plásmido pGEM-LEON222.

Plásmido pGEM-LEON222 cortado con las enzimas HindIII y BamHI (carril 3, 4 y 7 plásmido linearizado). La doble restricción con las enzimas HindIII-BamHI, generaron un fragmento de aproximadamente 250 pb en pGEM-LEON222 (carril 5). Plásmido pGEM-LEON222 linearizado con la enzima BalI (carril 8). Marcador de peso molecular se uso DNA del fago λ X-174 cortado con HaeIII, cuyo tamaño de los fragmentos se indica a la izquierda del gel de agarosa al 1.8% (carril 1).

(nucleótido 620), razón por la cual el plásmido fue linearizado (carril 8). La doble restricción con las enzimas HindIII-BamHI, liberó el fragmento de aproximadamente 250 pb, compuesto por la RNT 5' (184 pb) y los enlazadores o "linkers" flanqueantes del vector de clonación (carril 5). Los tamaños aproximados de los fragmentos del plásmido cortado, se compararon con los fragmentos del DNA del marcador de peso molecular ϕ X-174, cortado con la enzima HaeIII (carril 1).

Los sitios de corte de las enzimas empleadas, el fragmento de RNA de la RNT 5' y la dirección de la transcripción, son esquematizados en los mapas de restricción.

Una vez construido el plásmido recombinante pGEM-LEON222, con el fragmento de la RNT 5' viral correctamente, fue aislado por medio de gradientes de cloruro de cesio y cortado (linearizado) con la enzima Ball. Este plásmido restringido con Ball, se empleó en la "transcripción in vitro".

FORMACION INEFICIENTE DE COMPLEJO RNA-PROTEINA CON EL RNA 488-620 b DE LA RNT 5' LEON.

La figura 18 muestra la autorradiografía del gel de poliacrilamida al 6%, con las muestras de RNAv de la cepa LEON. En los carriles 1, 2, 3 y 4 se muestra el RNAv que va del nucleótido 488-620. En el carril 1 se muestra la movilidad del RNA libre, en los carriles 2, 3 y 4 el RNA fue incubado en presencia de ECI. Los carriles 3 y 4 muestran la competencia con 20X y 50X del fragmento de RNA comprendido entre 488 a 620 b sin marcar. Como puede observarse la adición de ECI, redujo la cantidad de marca en la forma libre, sin embargo no pudo observarse la formación de un cRNP. Al realizar el ensayo de

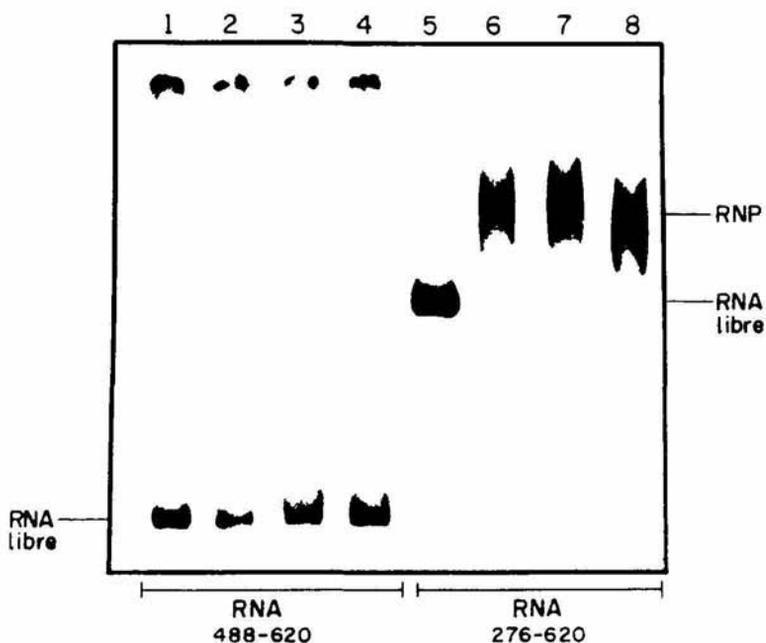


Figura 18. Retardamiento y competencia de los fragmentos 488-620 y 276-620 b de la RNT 5' de la cepa viral LEON.

El RNA comprendido entre 488 y 620 b (carril 1) fue marcado con UTP [α 32P] y se incubó en presencia de ECI (4 μ g) (carrile 2, 3 y 4). Los cRNPs fueron competidos con un exceso de 20X (carril 3) y 50X (carril 4) del mismo RNA frio. El RNA libre de los nucleótidos 276-620 b (carril 5) a su vez, fue incubado con ECI (4 μ g) (carril 6, 7 y 8). Los complejos fueron competidos, con un exceso de 20X (carril 7) y 50X (carril 8) del RNA que va del nucleótido 488-620 b frio.

competencia, se observó que se aumentó la cantidad de RNA en la forma libre (carril 3 y 4).

Este ensayo mostró la incapacidad de formación de cRNP, entre el RNA que va del nucleótido 488 al 620 de la RNT 5' LEON y las proteínas del ECI (4 μ g); en ningún caso se logró detectar la formación de complejo (carril 2, 3 y 4). En el mismo gel, se analizó una vez más el resultado de la formación de cRNPs (carril 5), con el fragmento que abarca del nucleótido 276-620 del RNA de la cepa viral LEON. En éste ensayo se empleó el RNA que va del nucleótido 488 al 620, para competirlo con la región que comprende los tres dominios (fragmento 276-620 b). En el carril 5 se muestra el RNA 276-620 b de la cepa LEON en ausencia de factores (carril 6). En el carril 7 y 8, el RNA fue incubado con ECI y con 20X y 50X respectivamente de RNA competidor (488-620 b sin marcar). Como puede observarse, a la concentración de 20X (carril 7) no se logró la eliminación del cRNP, sin embargo se observó un cambio en la movilidad de este complejo cuando se empleó 50X del mismo competidor (carril 8).

Estos resultados sugieren que el fragmento 488-620 b de la RNT 5' LEON, que abarca parte del dominio II y el dominio III en su totalidad, no es suficiente para la eficiente interacción de proteínas citoplásmicas, con este segmento de la RNT 5' viral (carril 2, 3 y 4).

La no formación de cRNP entre la RNT 5' LEON 488-620 b y proteínas celulares (carril 2, 3 y 4) puede obedecer a que en este fragmento de la RNT 5', solo se conserva la estructura secundaria del dominio III y no así la del dominio II, de tal forma que este fragmento no puede ser reconocido por proteínas

celulares.

Por otro lado, es posible que la cantidad de proteína empleada del ECI en éstos ensayos, no sea suficientemente rica en la (s) proteína (s) que se unen a este segmento en especial de la RNT 5' viral.

La diferencia de movilidad de los dos segmentos de RNA de la RNT 5' empleados, obedeció a que el segmento 276-620 b es más grande, que el fragmento de la RNT 5' 488-620 b que es más pequeño, de tal forma que el segmento 276-620 b migro más lento que el segmento 488-620 b en la electroforesis.

DISCUSION.

La ausencia de la estructura "Cap", en el extremo 5' del RNAm del virus de la poliomielitis, ha puesto de manifiesto que la traducción de este tipo de mensajeros, debe realizarse por un mecanismo independiente de "Cap". Para los RNAm de los virus de la familia Picornaviridae (poliovirus y encefalomiocarditis) en especial, se supone que la iniciación de la traducción ocurre por la unión directa de proteínas (factores de iniciación de la traducción) y ribosomas a la región no traducida 5' (RNT 5') de los mismos. Hay actualmente varias líneas de evidencia que proponen que secuencias de la RNT 5' del virus de la poliomielitis y encefalomiocarditis, son necesarias y suficientes para conferir traducción independiente de "cap", al RNAm viral y mensajeros celulares a los cuales se fusiona.

En este trabajo, se analizó la participación de la RNT 5' de la cepa silvestre (LEON) y dos cepas mutantes (SABIN Y SFP8), al igual que las secuencias blanco, involucradas en la formación del cRNP (interacción RNA-proteína). Nuestros datos indicaron que el segmento de RNA de la RNT 5' viral, que va del nucleótido 276 al 620 de las cepas LEON, SABIN (mutada en la base 472) y SFP8 (mutada en las bases 472 y 482), es capaz de interactuar con proteínas presentes en el citoplasma celular de células HeLa (ECI). Los RNA de las RNT 5' de las cepas LEON y SABIN en su forma libre (sin proteína), presentaron un comportamiento diferente de movilidad al someterse a electroforesis en gel nativo de poliacrilamida, con respecto a la RNT 5' de la cepa doble mutante SFP8; esta diferencia de movilidad, probablemente obedezca a que en estas tres cepas virales, existen diferencias

significativas a nivel de estructura secundaria, la cual se altera más drásticamente en la cepa SFP8. La migración de las RNT 5' de las cepas LEON y SABIN en su forma libre, no nos permitieron establecer diferencias a pesar de que análisis por computadora, sugieren cambios en la estabilidad de ciertas zonas del RNA. Por otro lado el cambio puntual en la base 472, presente en la cepa vacunal SABIN, es la responsable de conferir el fenotipo atenuante a este virus, que es usado en extensas campañas de vacunación en el mundo.

Al realizar los ensayos de retardamiento (unión), con estos RNA de la RNT 5' de estas tres cepas virales y analizar los cRNPs formados, pudimos conocer que los cRNPs presentaron el mismo comportamiento de movilidad o migración, en el ensayo de electroforesis del gel nativo de poliacrilamida. Los cRNPs fueron además formados de manera definida y estable, por lo tanto bajo tales características, nuevamente no pudimos establecer diferencias significativas fácilmente entre las cepas virales empleadas. Sin embargo la eficiente formación de estos cRNPs particulares, pudo ser analizada y distinguida claramente por su sensibilidad a concentraciones crecientes de sal (KCl).

Los cRNPs formados en presencia de ECI con los RNA de la RNT 5', que va del nucleótido 276-620 b de las cepas virales SABIN y SFP8, empezaron a desestabilizarse no muy claramente a la más baja concentración de KCl empleada en estos ensayos (60mM), pero la desestabilización fue más marcada a las concentraciones de media (100mM) y alta (150mM) sal, lo que se reflejó en forma de barrido del cRNP, hasta la zona de migración del RNA libre. Para el caso de la cepa LEON, no se observó alteración alguna en la

definición y estabilidad del cRNP, aun a la más alta concentración de sal empleada (150mM).

A pesar de esta primera serie de resultados y conociendo que existe una diferencia considerable en la estructura secundaria de las RNT 5', provocada por las mutaciones puntuales en la cepa SABIN (472 U por C) y SFP8 (472 y 482 U por A), no pudimos observar que estas eliminaran la interacción RNA-proteína, por lo tanto, consideramos que los cambios no son lo suficientemente drásticos, como para poder ejercer un cambio total en la afinidad de las proteínas celulares, pues los cRNPs se formaron eficientemente en las tres cepas virales, y solamente pueden ser alterados (fuerza de interacción) por concentraciones crecientes de sal.

La base para establecer diferencias entre las tres RNT 5' de las cepas virales, puede ser argumentada por la razón de que la fuerza iónica, media y alta de KCl, fácilmente pueden separar proteínas menos fuertemente unidas a un RNA, de tal forma que la alteración en la estructura secundaria de las RNT 5' SABIN y SFP8, probablemente cause que las proteínas interactuen con menor fuerza con el RNAv. Otra opción que no puede omitirse, es que los cRNPs con sus proteínas asociadas, sean susceptibles de modificar su estructura terciaria, al incrementar la fuerza iónica.

Estos resultados pueden ayudar a aclarar de alguna manera, las diferencias biológicas particulares observadas in vivo, entre las tres cepas virales empleadas, dado que se propone que el virus en su estado silvestre, al infectar a una célula provoca un incremento en los gradientes de los iones de Na⁺. Para el virus

silvestre, esta alteración intracelular es una ventaja ya que se pueden traducir de manera eficiente, gran cantidad de sus mensajeros y paralelamente se impide la traducción de los RNAm celulares. Para el caso de las dos cepas mutantes, este desbalance de los gradientes iónicos, sería un parámetro contradictorio para su síntesis de proteínas, y por lo tanto para su ciclo de vida y cuadro de infección; lo cual se comprueba con los datos que indican, que ambas cepas son deficientes en el proceso de traducción.

Los experimentos de retardamiento y competencia, realizados con el RNA de la RNT 5' de la cepa viral LEON, fueron diseñados para determinar, si las proteínas que reconocen y se unen a esta cepa silvestre, también se unen a las RNT 5' de las cepas mutantes SABIN y SFP8.

Al competir cada una de las cepas virales con un exceso de RNA homólogo de la cepa LEON y RNA heterólogo del gene anti-CAT, se logró establecer, que las proteínas celulares que se unen al fragmento de la RNT 5' LEON (276-620 b) y a los mismos fragmentos de las RNT 5' de las cepas mutantes SABIN y SFP8, son las mismas proteínas que reconocen las tres cepas virales. El RNA de la cepa LEON sin marcar, evitó completamente la formación de los CRNPs con las cepas SABIN y SFP8, y no así el RNA anti-CAT, incluido como RNA heterólogo. La competencia de las RNT 5' de las cepas virales con el RNA heterólogo, establecieron también, que las interacciones RNA-proteína son de tipo específico, para el RNA de la RNT 5' del virus de la poliomielitis, e inespecífica para otras moléculas de RNA.

Estos resultados de competencia ayudaron a descartar que las

diferencias en las interacciones RNA-proteína, debido a las diferentes concentraciones molares de sal, se debieron a que las diferentes RNT 5', se asociaron a diferentes poblaciones de proteínas contenidas en el ECI.

Un modelo reciente para la estructura secundaria de la RNT 5' de los virus de la familia Picornaviridae, propone por análisis de computadora y relaciones filogenéticas, que la RNT 5' se encuentra formada principalmente por dominios (I, II y III) "tallo -burbuja", los cuales contienen elementos de estructura primaria y secundaria, que se cree están involucrados en el control de la traducción y neurovirulencia del RNA del virus de la poliomielitis.

Del análisis de retardamiento y competencia del dominio III en gel nativo de poliacrilamida (segmento 488-620 b), se observó que tal segmento, no presenta los elementos de estructura primaria y secundaria mínimos, para la unión de proteínas celulares, dado que no se observó la formación de cRNPs en las autorradiografías. En este dominio III de la RNT 5', se encuentran localizados elementos conservados y variables en la familia Picornaviridae; por esta razón, es probable que en este segmento de la RNT 5' (488-620 b) se unan muy pobremente proteínas celulares, o que el factor que se asocia a ella se encuentra en baja proporción en el ECI.

En los ensayos de retardamiento con esta región, solamente podemos sugerir la posible formación de un cRNP, al observar que la RNT 5' completa (270-620 b), fue capaz de liberar el RNA del dominio III y dejarlo en forma libre.

Estas evidencias no muy claras de la posible participación del

dominio III de la RNT 5' viral, para la formación de cRNPs en gel de poliacrilamida, probablemente indiquen que la formación eficiente de cRNPs, en la RNT 5' dependa del reconocimiento de más de un dominio integro, dado que es probable que se forme una nueva estructura secundaria, en el segmento 488-620 b la cual sea diferente, a la presente en el segmento 276-620 b o que probablemente las proteínas, que reconozcan de forma específica los elementos de estructura primaria y secundaria, contenidos en el dominio III, se encuentren en la célula en concentraciones muy bajas.

Recientemente se ha encontrado, que la zona entre los nucleótidos 510 a 629, se asocia a una proteína celular de 57 KDal; sin embargo la concentración de proteína a la cual se puede obtener esta interacción, es 15 veces mayor a la empleada por nosotros en el ensayo de retardamiento (4 µg).

La RNT 5' como parte del genoma viral, esta siendo estudiada muy activamente, dado que es probable que contenga secuencias involucradas en el empaquetamiento y replicación del RNAv, así como también la estructura secundaria puede ser importante en la estabilidad y neurovirulencia del RNA. En el aspecto de control (modulación y eficiencia) de la traducción viral, esto puede estar mediado por la unión de proteínas celulares y virales a la RNT 5'. En este aspecto se ha sugerido que variaciones en los niveles de estas proteínas, entre los diferentes tipos celulares, pueden en parte determinar el tropismo del tejido y del hospedero para el virus de la poliomielitis y algunos otros Picornavirus, además de su receptor celular específico. En la naturaleza existen virus que pueden tener como hospedero

diferentes organismos, lo cual es verdadero para el virus del "Dengue", que tiene un hospedero invertebrado (mosquitos) y un hospedero vertebrado (humanos), el virus Sindbis alterna también hospederos vertebrados (aves) e invertebrados (mosquitos), lo que indica que las secuencias no traducidas y/o traducidas del virus, representan un compromiso para la adaptación del virus, en células de mosquito y lo que es mejor para la adaptación en el hospedero vertebrado.

Algunas mutaciones puntuales en una misma cepa viral (como es el caso para la cepa viral LEON), pueden presentar efectos diferenciales en diferentes tipos celulares, lo que sugiere que factores de las células hospederas, interactúan con la RNT 5' posiblemente reconociendo la estructura secundaria de esta región. El hecho de que deleciones dentro de la RNT 5', tengan efectos deletéreos, efectos moderados y/o otros que promuevan el crecimiento, sugiere que algunos factores interactúan con la RNT 5', para desencadenar la replicación o traducción del RNA viral. Por otro lado, se han descrito elementos inhibitorios de la traducción del RNA de poliovirus (in vitro), los cuales funcionan como tales en presencia de algunos extractos celulares. El control de los elementos inhibitorios de la RNT 5', puede ser mediado por proteínas celulares y/o virales; estas interacciones se han estudiado a través de la unión de proteínas a zonas de la RNT 5' de poliovirus, Cardiovirus y encefalomiocarditis. Estos datos sugieren que variaciones en los niveles de estas proteínas, entre las células puede en parte determinar el tropismo del tejido, para poliovirus y probablemente otros miembros de la familia Picornaviridae.

Es claro que la RNT 5', juega un papel importante en la determinación de las propiedades biológicas a los Picornavirus, al igual que cambios conformacionales, fisiológicamente importantes en esta región control, pueden ser inducidos como resultado de las interacciones con ciertas macromoléculas específicas del virus y del hospedero. El conocimiento y estudio a nivel molecular de la RNT 5' viral, podría sentar las bases para la producción de nuevas vacunas atenuadas, incapaces de revertir a su estado neurovirulento, así, como también para el conocimiento de los mecanismos alternos de regulación de otros genes virales y celulares.

Recientemente se han reportado genes que presentan RNT 5' largas, y con características semejantes a las de los Picornavirus. Entre estos genes podemos citar a genes que codifican para, factores de crecimiento, receptores de membrana celular, gran parte de proto-oncogenes, proteínas de heat shock, histonas, virus del SIDA (HIV-1), Papilomavirus y proteínas que unen GTP, los cuales parecen presentar mecanismos alternos de regulación y expresión de manera semejante, al mecanismo alternativo encontrado en algunos Picornavirus.

CONCLUSIONES.

De los resultados del trabajo experimental se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- 1.- Las tres cepas virales empleadas, mostraron diferencias en el comportamiento de movilidad del RNA de la RNT 5' en su forma libre en el gel nativo de poliacrilamida; cepa SFP8 (cepa con la mutación en las bases 472 y 482) con respecto a las cepas LEON (silvestre) y SABIN (cepa vacunal con la mutación en la base 472).
- 2.- Los fragmentos de RNA de la RNT 5' (276-620 b) de las cepas virales LEON, SABIN y SFP8, son capaces de formar cRNPs (RNA-proteína), con el extracto citoplásmico infectado de células HeLa.
- 3.- La fuerza de interacción RNA-proteína (cRNP) de los segmentos de la RNT 5', de las tres cepas empleadas, presentan aparentemente el mismo grado de fuerza de unión, a la concentración de 60 mM KCl.
- 4.- La formación de cRNPs entre los segmentos de RNA de la RNT 5', de las cepas virales SABIN y SFP8, se alteró con respecto al RNA de la cepa LEON, al emplear las concentraciones de 100 y 150 mM KCl. La formación del cRNP con la RNT 5' de la cepa viral LEON, no fue afectada al emplear la concentración de 150 mM KCl.
- 5.- La interacción RNA-proteína, entre los RNA de las tres cepas empleadas es de tipo específico, como se demostró por los experimentos de competencia con RNAs competidores.
- 6.- Las proteínas que se unen a la cepa viral LEON, son las

mismas que se unen a las cepas mutantes SABIN y SFP8, como se demostró por los ensayos de competencia.

- 7.- El fragmento de RNA de la RNT 5' (488-620 b LEON), no logra formar un complejo visible en los experimentos de retardamiento en gel nativo de poliacrilamida.

Tabla #1: Proteínas de poliovirus (tomado de 23).

| Proteína | Nombre | P.M. | Sitio de corte | Sitio de corte |
|----------|--------|--------|----------------------------|----------------|
| | L-434 | | N ₂ H terminal. | COOH terminal. |
| P1-1a. | 1 | 97,247 | Bloqueado por G. | YG1. |
| P3-1b. | 3 | 84,234 | QG-8. | P. |
| 3b/9. | 2-3AB | 77000 | YG-1. | QG-10. |
| P3-1c. | 3BCD | 76000 | QG-9? | P?. |
| P3-2. | 3CD | 72132 | QG-10. | P. |
| P1-3a. | 1ABC | 63786 | Bloqueado por G. | QG-3. |
| P2-3b. | 2 | 64952 | YG-1. | QG-8. |
| P1-3c | 1CD | 59930 | QG-2. | YG-1. |
| P3-4a. | | 60000 | QG-11. | P. |
| P3-4b. | 3D | 52481 | QG-12. | P. |
| X/9. | 2C-3AB | 50000 | GQ-6. | GQ-10. |
| P3-5a. | | 48500 | QG-8. | YG-2. |
| P2-5b. | 2BC. | 48273 | QG-5. | QG-8. |
| VP0 | 1AB. | 37352 | Bloqueado. | QG-2. |
| P3-6a. | 3C'. | 36450 | QG-10. | YG-2. |
| P2-x. | 2C. | 37555 | QG-6. | QG-8. |
| VP1. | 1D. | 33521 | QG-3. | YG-1. |
| P3-6b. | 3D'. | 35700 | YG-2. | P?. |
| VP2. | 1B. | 29985 | NS-2. | QG-2. |
| VP3. | 1C. | 26410 | QG-2. | QG-3. |
| P2-7a. | 2AB. | 25500 | YG-1?. | QG-6?. |
| P3-7c. | 3C. | 19669 | QG-10. | QG-12. |
| P3-7d. | | 16780 | QG-12. | YG-2. |
| P2-8. | 2A. | 16680 | YG-1. | QG-5. |
| P3-9. | 3AB. | 12100 | QG-8. | QG-10. |
| P3-9b. | 3B. | 8750 | QG-8. | QG-9. |
| P2-10. | 2B. | 10720 | QG-5. | QG-9. |
| VP4. | 10. | 7385 | Bloqueado por G. | NS-2. |
| VPg. | 3B. | 2354 | QG-9. | QG-10. |

G= Glicina, N= Asparagina, Q= Glutamina, S= Serina, Y= Tirosina,
P= Fenilalanina y ?= Incierto.

Tabla #2: Propiedades de las proteasas de los Picornavirus.
(tomado de 36).

- 1.- La actividad de proteasa aumenta con el tiempo post-infección en el citoplasma de la célula infectada.
- 2.- El incremento es dependiente de la multiplicidad del virus y requiere RNA del virus y síntesis de proteína.
- 3.- Las proteasas son fabricadas después de que la síntesis de proteína del hospedero es abolida.
- 4.- La enzima es específica para los precursores virales, generan nuevos cortes en Leucina, C-terminal o residuos de Glutamina.
- 5.- La enzima tiene un pH neutral óptimo con los precursores del virus como sustrato.
- 6.- La proteasa copurifica con un polipéptido no estructural del virus, presente en el citoplasma de células infectadas.
- 7.- La proteasa se sintetiza en extractos libres de células programados con RNAV.
- 8.- Se pueden aislar virus mutantes que tengan proteasas alteradas. Esto indica que la enzima es codificada por el genoma viral.
- 9.- Estudios con inhibidores indican que las proteasas pueden ser del tipo sitio activo SH.
- 10.- Hay efectos pleiotrópicos en las mutaciones de las proteasa sobre la síntesis de RNAV.
- 11.- La estructura primaria de las proteasas es altamente conservada entre los Picornavirus de humanos.

Tabla #3: Propiedades de los factores eucarióticos involucrados en traducción (tomado de 79).

Factores de traducción de células eucarióticas.

eIF-1, MMS 15, Actividad; Desconocida.

eIF-2, MMS 35, 50, 55, Actividad; Formación del complejo ternario y reiniciador de eIF-2.

eIF-2B, MMS 34, 40, 55, 65, 82, Actividad: Misma de eIF-2.

eIF-3, MMS 10 subunidades 28000-16000, Actividad; Subunidad de antiasociación; unión a la subunidad 40S.

eIF-4A, MMS 50, Actividad; Une el RNAm a la subunidad 40S; actividad de ATPasa.

eIF-4B, MMS 80, Actividad; Une el RNAm a la subunidad 40S.

eIF-4C, MMS 17, Actividad; Une la subunidad 60S.

eIF-4D, MMS 15, Actividad; Une la subunidad 60S.

eIF-4E, MMS (24 K-CBP, CBPC), MMS 24, 50, 220, Actividad; Reconoce Cap 5' (subunidad de eIF-4F).

eIF-4F (CBP II, CBPC), MMS 24, 50, 220, Actividad; Une el RNAm a la subunidad 40S; actividad de ATPasa.

eIF-5, MMS 150, Actividad; Libera eIF-2 y eIF-3; GTPasa dependiente del ribosoma.

eIF-6, MMS 25.5, Actividad; Subunidad de antiasociación.

eIF= Factor eucariótico de iniciación, MMS= Masa molecular de la subunidad en KD, Act= Actividad.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Agol V.I, Grachev V.P, Drozdov S.G, Kolesnikova M.S, Koslov V.G, Ralph N.M, Romanova L.I, Tolskaya E.A, Tyufanov A.V and Viktorova, E.G. 1984. Construction and properties of intertipic poliovirus recombinants: 1 st approximation mapping of the major determinants of neurovirulence. *Virology* 136: 41-45.
- 2.- Almond ,J.W. 1987. The Attenuation of Poliovirus Neurovirulence. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 153-80.
- 3.- Ambros V. and Baltimore D. 1980. Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5'-Terminal protein from poliovirus RNA. *J. Biol. Chem.* 255 (14):6739-44.
- 4.- Andrews N.C and Baltimore D. 1986. Purification of a Terminal Uridyl/Transferase that Acts as Host Factor in the in vitro poliovirus Replicase Reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 221-25.
- 5.- Babich A, Wimmer E, Toyada H and Nomoto A. 1980. The Genome-Linked Protein of picornaviruses. VI. The 5'-Terminal protein of poliovirus Type 2 RNA is covalently Linked to a Nonanucleotide identical to that of poliovirus Type 1 RNA. *Intervirology* 13 (3): 192-99.
- 6.- Banerje, A.K. 1980. 5'-Terminal Cap Structure in Eucaryotic Messenger Ribonucleic Acids. *Microbiol. Rev.* 44: 175-205.
- 7.- Bienkowska-Szewczyk K and Ehrenfeld, E. 1988. An Internal 5'-Noncoding Region Required for Translation of Poliovirus RNA In vitro. *J. Virology* 62: 3068-72.
- 8.- Bonneau A and Sonenberg N. 1987. Proteolysis of the p220 component of the Cap-binding protein complex is not

- sufficient for complete inhibition of Host cell Protein synthesis after poliovirus infection. *J. Virology* 61: 986-91.
- 9.- Bossart W, Egger D, Rasser Y and Bienz K. 1984. Accumulation of poliovirus protein in uninfected isolated Hep-2 cell nuclei in vitro. *Intervirology* 21 (3): 150-58.
 - 10.- Buckley B and Ehrenfeld E. 1987. The Cap-binding Protein Complex in Uninfected and Poliovirus-infected HeLa Cells. *J. Biol. Chem.* 262: 13599-606.
 - 11.- Caliguri L.A and Compas R.W 1973. The formation of polovirus particles in association with the RNA replication complex. *J. Gen. Virology* 21: 99-108.
 - 12.- Cantero-Aguilar L, Sanchez-Trujillo L and Fernandez-Tomas, C. 1987. Poliovirion-Derived Proteins in Subviral Ribonucleoprotein Complexes. *Virology* 156: 259-67.
 - 13.- Crawford N. M and Baltimore D. 1983. Genome-linked protein VPg of poliovirus is present as free VPg and VPg-5'-Phosphouridylyl-3',5'-Uridine in poliovirus-infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 7452-55.
 - 14.- Dasgupta A, Zabel P and Baltimore, D. 1980. Dependence of the Activity of the Poliovirus Replicase on a Host Cell Protein. *Cell* 19: 423-29.
 - 15.- Del Angel R.M, Papavassiliou A.G, Fernandez-Tomas C, Silverstein J. S and Racaniello R. V. 1989. Cell proteins bind to multiple sites within the 5' untranslated region of poliovirus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 8299-03.
 - 16.- Dorner A.J, Semler B. L, Jackson R.J, Hanecak R, Duprey E. and Wimmer E. 1984. In vitro Translation of poliovirus RNA: Utilization of internal initiation sites in reticulocyte

- lysate. *J. Virology* 50 (2): 507-14.
- 17.- Dorner A.J, Dorner L.F, Larsen G.R, Wimmer E and Anderson, C. W. 1982. Identification of the Initiation Site of Poliovirus polyprotein Synthesis. *J. Virology* 42: 1017-28.
 - 18.- Ehrenfeld, E. 1982. Poliovirus-Induced Inhibition of Host-Cell Protein Synthesis. *Cell* 28: 435-36.
 - 19.- Emini E.A, Jameson B.A and Wimmer, E. 1984. Identification of a New Neutralization Antigenic Site on Poliovirus Coat Protein VP2. *J. Virology* 52: 719-21.
 - 20.- Emini E.A, Marshal E and Wimmer E. 1982. carboxy-terminal Analisis of poliovirus proteins: Termination of poliovirus RNA Translation and Location of unique poliovirus polyprotein cleavage sites. *J. Virology* 42: 194.
 - 21.- Etchinson D, Milburn S.C, Edery I, Sonenberg N and Hersey J, W.B. 1982. Inhibition of HeLa Cell Protein Synthesis Following Poliovirus Infection Correlates with the Proteolysis of a 200,000-dalton Polypeptide Associated with Eucaryotic Initiation Factor 3 and a Cap Binding Protein Complex. *J. Biol. Chem.* 257: 14806-10.
 - 22.- Evans D.M.A, Dunn G, Minor P.D, Schild G.C, Cann A.J, Stanway G, Almond J.W, Currey K and Maizel, J.V.(Jr) 1985. Increased Neurovirulence associated with a single nucleotide change in a noncoding region of the Sabin type 3 poliovaccine genome. *Nature* 314: 548-50.
 - 23.- Fernadez-Tomas C and Baltimore D. 1973. Morphogenesis of poliovirus II. Demostration of a New intermediate. *J. Virology* 12: 1122-30.
 - 24.- Golin F, Semler B.L, Dorner A.J, and Wimmer E. 1980. Protein-

- linked RNA of poliovirus is competent to form an initiation complex of Translation in vitro. Nature 287: 600-03.
- 25.- Hanecak R, Semler B.L, Ariga H, Anderson C.W and Wimmer E. 1984. Expression of a cloned gene segment of poliovirus in E. coli: Evidence for autocatalytic production of the viral proteinase. Cell 37 (3): 1063-74.
 - 26.- Hanecak R, Semler B.L, Anderson C.W and Wimmer, E. 1982. Proteolytic processing of poliovirus polypeptides: Antibodies to polypeptide P3-7c inhibition cleavage at glutamine-glycine pairs. Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 3973-77.
 - 27.- Hewlett M.J and Florkiewicz R.Z. 1980. Sequence of picornavirus RNAs containing a radioiodinated 5'-linked peptide reveals a conserved 5' sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 303-07.
 - 28.- Hogle J.M, Chow M, Filmand D.J. 1985. Three-Dimensional Structure of Poliovirus at 2.9 A Resolution. Science 229: 1358-65.
 - 29.- Jen G, Detjen B.M and Thach R.E. 1980. Shutoff of Hela cell protein synthesis by encephalomyocarditis virus and poliovirus: A comparative study. J. Virology 35: 150-56.
 - 30.- Jole J, Genus B, Jackson R and Enger-Valk, E. 1988. Poliovirus Protein 3CD Is the Active Protease for Processing of the Precursor Protein P1 in vitro. J. Gen. Virology 69: 1627-36.
 - 31.- Khuri-Bulos N, Melnick J.L, Hatch M.H and Dawed S. 1984. The paralytic poliomyelitis epidemic of 1978 in Jordan: Epidemiological implications. Bull WHO 62: 83-88.
 - 32.- Kitamura N, Adler CH. J, Rothberg P.G, Martinko J, Nathenson

- S. G and Wimmer E. 1980. The Genome-Linked Protein of picornavirus VII. Genetic Mapping of poliovirus VPg by protein and RNA Sequence Studies. Cell 21: 295-302.
- 33.- Kitamura N, Semler B. L, Rothberg P.G, Larsen G.R, Adler CH. J, Dorner A.J, Emini E.A, Hanecak R, Lee J.L, Vander-Werf S, Anderson C.W and Wimmer E. 1981. Primary structure, genome organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. Nature 291: 547-53.
- 34.- Korant B, Choe N, Lively M and Powers, J. Virus-specified protease in poliovirus-infected HeLa cells. 1979. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 2992-95.
- 35.- Krausslich H.G, Nicklin M.J.H, Toyada H, Etchinson D and Wimmer, E. 1987. Poliovirus Proteinase 2A Induces Cleavage of Eucariotic Initiation Factor 4F Polypeptide p220. J. Virology 61: 2711-18.
- 36.- Koch and Koch 1985. Molecular Biology. 337-71.
- 37.- Krah D.L and Crowell, R.L. 1982. A Solid-Phase Assay of Solubilized HeLa cell Membrane Receptors for Binding Grup B Coxsackieviruses and Poliovirus. Virology 118: 147-56.
- 38.- Kuge S and Nomoto, A. 1987. Construction of Viable Deletion and Insertion Mutants of the Sabin Strain of Type 1 Poliovirus: Function of the 5' Noncoding Sequence in viral Replication. J. Virology 61: 1478-87.
- 39.- Larsen G.R, Semler B.L and Wimmer, E. 1981. Stable Hairpin Structure Within the 5'-Terminal 85 Nucleotides of Poliovirus RNA. J. Virology 37: 328-35.
- 40.- Larsen G.L, Anderson C.W, Dorner A.J, Semler B.L and Wimmer E. 1982. Cleavage sites within the poliovirus capsid protein

- precursors. *J. Virology* 41: 340-44.
- 41.- La Monica N, Almond J.W and Racaniello, V.R. 1987. A Mouse Model for Poliovirus Neurovirulence Identifies Mutations That Attenuate the Virus for Humans. *J. Virology* 61: 2917-20.
- 42.- Lazard D.S, Fernandez-Tomas C, Gariglio P.V and Weiman R 1988. Modification of an Adenovirus Major Late Promotor-Binding Factor during Poliovirus Infection. *J. Virology* 63 (9) 3858-64.
- 43.- Lee Y.F, Nomoto A, Detjen B.M and Wimmer E. 1977. A Protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 59-63.
- 44.- Levintow L. 1974 *Comprehensive Virology* 2: Plenum Press New York 109-55.
- 45.- Lloyd R.E, Toyada H, Etchinson D, Wimmer E and Ehrenfeld E. 1986. Cleavage of the Cap Binding Protein Complex Polypeptide p220 Is not Effected by the Second Poliovirus Protease 2A. *Virology* 150: 299-303.
- 46.- Lloyd R.E, Jensen H.G and Ehrenfeld, E. 1987. Restriction of Translation of Capped mRNA In vitro as a Model for Poliovirus-Induced Inhibition of Host Cell Protein Synthesis Relationship to p220 Cleavage. *J. Virology* 61: 2480-88.
- 47.- Lonberg-Holm K. 1975 *J. Gen. Virology* 29: 313-27.
- 48.- Luria S.E, Darnel J.E (Jr), Baltimore D and Campbell A. 1978. *General virology*. Jhon Wiley & Sons USA.
- 49.- Mas-Lago P, Louzara C, Beltran J, Jacobo M and Palomera R. 1979. Poliovirus transmission in the infantil population of Cuba. *Bol. of Sanit. Panam* 87: 443-49.

- 50.- Mattheus, R.E.F. 1982. Classification and Nomenclature of Virus. Intervirology 17: (1-3).
- 51.- Magrath D.I, Evans D.M.A, Ferguson M, Schild G.C, Minor P.D Horaud F, Crainic R, Stenvik M and Hovit 1986. Antigenic and Molecular Properties of Type 3 Poliovirus Responsible for an Outbreak of Poliomyelitis in a Vaccinated Population. J. Gen. Virology 67: 899-905.
- 52.- Minor P.D, Evans D.M.A, Ferguson M, Schild G.C, Westrop G and Almond, J.W. 1985. Principal and Subsidiary Antigenic Sites of VP1 Involved in the Neutralization of Poliovirus Type 3. J. Gen. Virology 65: 1159-65.
- 53.- Minor P.D, John A, Ferguson M and Icenogle, J.P. 1986. Antigenic and Molecular Evolution of the Vaccine Strain of Type 3 Poliovirus during the Period of Excretion by a Primary Vaccinee. J. Gen. Virology 67: 693-706.
- 54.- Minor P.D, Ferguson M, Evans D.M.A, Almond J.W and Icenogle, J.P. 1986 . Antigenic Structure of Poliovirus of Serotypes 1, 2 and 3. J. Gen. Virology 67: 1283-91.
- 55.- Nair C.N. 1981. Monovalent cation metabolism and cytopathic effects of poliovirus-infected HeLa cells. J. Virology 37: 268-73.
- 56.- Nadshus H.I, Olsnes S and Sandving K. 1984. Mechanism of entry into the cytosol of poliovirus type 1: Requirement of low pH. J. Cel. Biol. 98 (4): 1194-1200.
- 57.- Nicklin M.J.H, Toyada H, Murray M.G and Wimmer E. 1986. Proteolytic Processing in the Replication of Polio and Related Viruses. Bio/technology 4: 33-42.
- 58.- Nomoto A, Toyada H and Imura, N. 1981. Comparative Sequence

Analysis of the 5'-Terminal Noncoding Regions of Poliovirus Vaccine Strain Sabin 1, Sabin 2 and Sabin 3 Genomes. Virology 113: 54-63.

- 59.- Pallasch 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. Virology 49 (3): 873-80.
- 60.- Pelletier J, Kaplan G, Racaniello V.R and Sonenberg, N. 1988. Cap-Independent Translation of Poliovirus mRNAs Conferred by Sequence Elements within the 5' Noncoding Region. Mol. Cel. Biol. 8: 1103-12.
- 61.- Pelletier J, Kaplan G, Racaniello V.R and Sonenberg, N. 1988. Translation Efficiency of Poliovirus mRNA: Mapping Inhibitory cis-Acting Elements within the 5' Noncoding Region. J. Virology 62: 2219-27.
- 62.- Pelletier J and Sonenberg N. 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. Nature 334: 320-25.
- 63.- Pincus S.E and Wimmer, E. 1986. Production of Guanidine-Resistant and-Dependent Poliovirus Mutants from Cloned cDNA: Mutations in Polypeptide 2C Are Directly Responsible for Altered Guanidine Sensitivity. J. Virology 60: 793-96.
- 64.- Pincus S.E, Rohl H and Wimmer E. 1986. Guanidine-Dependent Mutants of Poliovirus: Identification of Three Classes with Different Growth Requirements. Virology 157: 83-88.
- 65.- Racaniello, V.R. 1988. Poliovirus Neurovirulence. Adv. in Virus Res. Academic Press USA 34: 217-46.
- 66.- Rangel L.M, Fernandez-Tomas C, Damus M.E and Gariglio, P.V. 1987. Modification of RNA Polymerase II α Subspecies after

- Poliovirus Infection *J. Virology* 61: 1002-06.
- 67.- Ray B.K, Lawson T.G, Kramer J.C, Cladaras M.H, Grifo J.A, Abramson R.D, Merrick W.C and Thach, R.E 1985. ATP-dependent Unwinding of Messenger RNA Structure by Eucaryotic Initiation Factors. *J. Biol. Chem.* 260: 7651-58.
- 68.- Razhon E.J, Wilson A.K and Jubelt B. 1984. Characterization of genetic change occurring in attenuated poliovirus 2 during persistent infection in mouse central nervous system. *J. Virology* 50: 137-44.
- 69.- Rivera V.M, Welsh J.D and Maizel J.V (Jr) 1988. Comparative Sequence Analysis of the 5' Noncoding Region of the Enteroviruses and rhinoviruses. *Virology* 165: 42-50.
- 70.- Richards O.C, Martin S.C, Jensen H.G and Ehrenfeld E. 1984. Structure of poliovirus replicative intermediate RNA: Electron microscope analysis of RNA cross-linked in vivo with psoralen derivative. *J. Mol. Biol.* 173 (3): 325-40.
- 71.- Rothberg P.G, Harris T.J.R, Nomoto A and Wimmer E. 1978. O⁴-(5'-Uridyl) Tyrosine is the bond between the genome-linked protein and the of poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 4868-72.
- 72.- Rose J.K, Trachsel H, Leong K and Baltimore D. Inhibition of translation by poliovirus: Inactivation of a specific initiation factor 1978. *PNAS* 75: 2732-36.
- 73.- Rueckert R.R and Wimmer E. 1984. Systematic Nomenclature of Picornavirus Proteins. *J. Virology* 50: 857-59.
- 74.- Shindarova L.M, Chumakov M.P, Varoshilova M.K, Bojinov S, Vasilenko S.M, Jordanova I, Kirov I.D, Kamenov E, Leshchinskaya E.V et al 1979. Epidemiological clinical and

- phathomorphological characteristics of epidemic poliomyelitis like disease caused by enterovirus 71. J. HYG Epidemiol. Microbiol. Immunol. (Prague) 23 (3): 284-95.
- 75.- Shatkin A.J. 1976. Capping of Eucaryotic mRNAs. Cell 9: 645-53.
- 76.- Skern T, Sommergruber W, Blaas D, Pieler C and Kuechler E. 1984. Relationship of human rhinovirus strain 2 and poliovirus as indicated by comparaison of the polymerase gene regions. Virology 136: 125-32.
- 77.- Spector D.H. 1974. Requirement of 3'-Terminal Poly(adenilic acid) for the Infectivity of Poliovirus RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 71: 2983-87.
- 78.- Stanway G, Huges P.J, Moutford R.C, Reeve P, Minor P.D, Schild G.C and Almond J.W. 1984. Comparison of the complete nucleotide sequences of the genomes of the neurovirulent poliovirus P3/Leon/37 and its attenuated Sabin vaccine derivative P3/Leon/12 a, b. Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 1539-43.
- 79.- Sonenberg N. 1987. Regulation of Translation By Poliovirus. Adv. in virus Res. 33: 175-205.
- 80.- Steinhauer D.A and Holland J.J. 1987. Rapid Evolution of RNA Viruses. Ann. Rev. Microbiol. 41: 409-33.
- 81.- Svitkin Y, Maslova S.V and Agol V.I. 1985. The Genomes of Attenuated and Virulent Poliovirus Strains Differ in their in Vitro Translation Efficiencies. Virology 147: 243-52.
- 82.- Svitkin Y, Pestova T.V, Maslova S.V and Agol V.I. 1988. Point Mutations Modify the Response of Poliovirus RNA to a Translation Initiation Factor: A Comparison of Neurovirulent

- and Attenuated Strains. *Virology* 166: 394-404.
- 83.- Takegami T, Semler B.L, Anderson C.W and Wimmer E. 1983. Membrane Fractions Active in Poliovirus RNA Replication Containing VPg Precursor Polipeptides. *Virology* 128: 33-47.
- 84.- Takeda N, Kuhn R.J, Yang CH, Takegami T and Wimmer E. 1986. Initiation of Poliovirus Plus-Strand RNA Synthesis in a Membrane Complex of Infected HeLa Cells. *J. Virology* 60: 43-53.
- 85.- Toyada H, Kohara M, Kataoka Y, Suganuma T, Omata T, Imura N and Nomoto A. 1984. Complete Nucleotide Sequences of All Three Poliovirus Serotype Genomes. *J. Mol. Biol.* 174: 561-85.
- 86.- Toyada H. 1986. A Second Virus-Encoded Proteinase Involved in Proteolytic Processing of Poliovirus Polyprotein. *Cell* 45: 761-70.
- 87.- Vandermarel P, Hazendonk T.G, Henneke M.A.C and Van Wezel A.L. 1983. Induction of neutralizing antibodies by poliovirus capsid polypeptides VP1, VP2 and VP3. *Vaccine* 1: 17-22.
- 88.- Winkler M, Bruening G and Hershey J.W.B. 1983. An absolute requirements for the 5' cap structure for messenger RNA Translation in sea urchin eggs. *Eur. J. Biochem.* 137 (1/2): 227-32.
- 89.- Wimmer E. 1982. Genome-Linked Proteins of Viruses. *Cell* 28: 199-201.
- 90.- Yogo Y and Wimmer E. 1972. Poliadenilic Acid at the 3'-Terminus of poliovirus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69: 1877-82.

- 91.- Ypma-Wong M.F and Semler B.L. 1987. In vitro molecular genetic as a tool for determining the differential cleavage specificities of the poliovirus 3C proteinase. *Nucleic Acids Res.* 15: 2069-88.
- 92.- Edery I, Petryshyn R and Sonenberg N. 1989. Activation of Double-Stranded RNA-Dependent Kinase (dsIK) by the TAR Region of HIV-1 mRNA: A Novel Translation Control Mechanism. *Cell* 56: 303-12.
- 93.- Marilyn Kosak. 1989. Circumstances and Mechanism of Inhibition of Translation by Secondary Structure in Eucaryotic mRNAs. *Mol. Cel. Biol.* 9 (11): 5134-42.
- 94.- Muller J, A and Witte N, O. 1989. The 5' Noncoding Region of the Human Leukemia-Associated Oncogene BCR/ABL Is a Potent Inhibitor of In Vitro Translation. *Mol. Cel. Biol.* 9 (11): 5234-38.
- 95.- Meerovitch K, Pelletier J and Sonenberg N. 1989. A Cellular protein that binds to the 5'-noncoding region of poliovirus RNA: implications for internal Translation initiation. *Genes & Development* 3: 1026-34.
- 96.- Pilipenko V. E, Blinov M. V, Romanova I. L, Sinyakov N. A, Maslova V. S and Agol V. I. 1989. Conserved Structural Domains in the 5'-Untranslated Region of Picornaviral Genomes: An Analysis of the segment Controlling Translation and Neurovirulence. *Virology* 168: 201-09.
- 97.- Pelletier J, Flynn E. M, Kaplan G, Racaniello V. R and Sonenberg N. 1988. Mutational Analysis of Upstream AUG Codons of Poliovirus RNA. *J. Virology* 62 (12): 4486-92.
- 98.- Skinner A, M, racaniello V. R, Dunn G, Cooper J, Minor D. P

- and Almond W. J. 1989. New Model for the Secondary Structure of the 5' Non-coding RNA of Poliovirus is supported by Biochemical and Genetic Data that Also Show that RNA Secondary Structure is Important in Neurovirulence. J. Mol. Biol. 207: 379-92.
- 99.- Svitkin Y. V, Cammack N, Minor P. D and Almond J. W. 1989. Translation Deficiency of the Sabin Type 3 Poliovirus Genome: Association with an Attenuating Mutation C₄₇₂--U. Virology 175: 103-09.
- 100.- Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S and VandePol S. 1982. Rapid Evolution of RNA Genomes. Science 215: 1577-85.