

La replicación de los RNA-virus de cadena negativa¹

D. F. SUMMERS, V. HILL, S. HARMON, L. MARNELL, P. CORTES, R. SHEPPARD and M. A. ROSEVEAR².

En años recientes, los investigadores han establecido muchos hechos relacionados con la estructura, biología molecular y epidemiología del gran número de RNA-virus animales encapsulados y de hélice negativa, muchos de los cuales son agentes patógenos humanos importantes de distribución mundial. Sin embargo, un problema central en relación con esta amplia clase de agentes infecciosos, que no ha sido solucionado todavía, es el del mecanismo (s) por el cual las grandes RNA-polimerasas virales pueden cambiar de una modalidad transcriptiva a otra replicativa. Este proceso incluye un cambio singular en la forma como la enzima reconoce y copia la información genómica y en los productos de la respectiva modalidad funcional. La transcripción origina segmentos "incompletos" y hélices que son metiladas, poliadeniladas y cubiertas, mientras que la replicación genera productos completos (+) y hélices (-) ensambladas en los complejos ribonucleoprotéicos (RNP) (ver fig. 1) (1-3).

Nuestro laboratorio ha seleccionado, como sistemas modelo de estudio, los rabdovirus, el virus de la estomatitis vesicular (VSV) que es un miembro de la familia de los *Rabdovirus* y el virus influenza tipo A; el primero contiene un genoma conformado por RNA de cadena simple e intacta que ordena la síntesis de cinco proteínas virales específicas y el último contiene un genoma de ocho segmentos que dirigen la síntesis de diez proteínas virales. La secuencia completa de cada uno de estos genomas ya ha sido determinada (2,3).

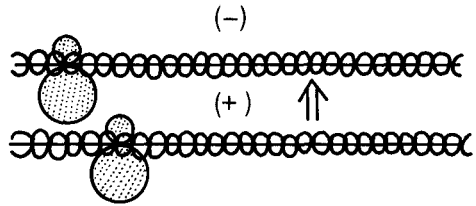
Los RNA-virus encapsulados y de hélice negativa se dividen en dos grupos: existen dos familias con genomas ininterrumpidos (los rabdovirus y los paramixovirus) y tres, con genomas segmentados (los arenavirus con dos segmentos, los bunyavirus con tres y los ortomixovirus con ocho). Los virus que son miembros de la familia comparten varias características comunes; por ejemplo, todos poseen nucleocápsides helicoidales compuestas de una sola proteína estructural rodeada por una cubierta lipídica de doble estrato. En asocio con el complejo RNP interno se encuentra la transcriptasa/replicasa que, en la mayoría de los casos, es un polipéptido único y grande (PM 200.000 aprox.) o como en el caso de los rabdovirus, es un heterodímero que contiene una subunidad mayor (L) [PM 241.000] y otra fosforilada y pequeña (NS) [PM 28.000]. La excepción, en términos de composición polipeptídica, es la enzima encontra-

1. Presentado en el II Congreso Interamericano de Infectología. Universidad del Norte, Barranquilla, 27-29 de septiembre de 1984. Traducción Wolfgang Munar.

2. Todos los autores: Department of Cellular, Viral and Molecular Biology. University of Utah Medical School. Salt Lake City, Utah. USA.

VSV :

Proporción 80/20 = - / +
 Reunión de proteínas
 RNP (L, NS, IV)
 acompañada por
 síntesis de RNA



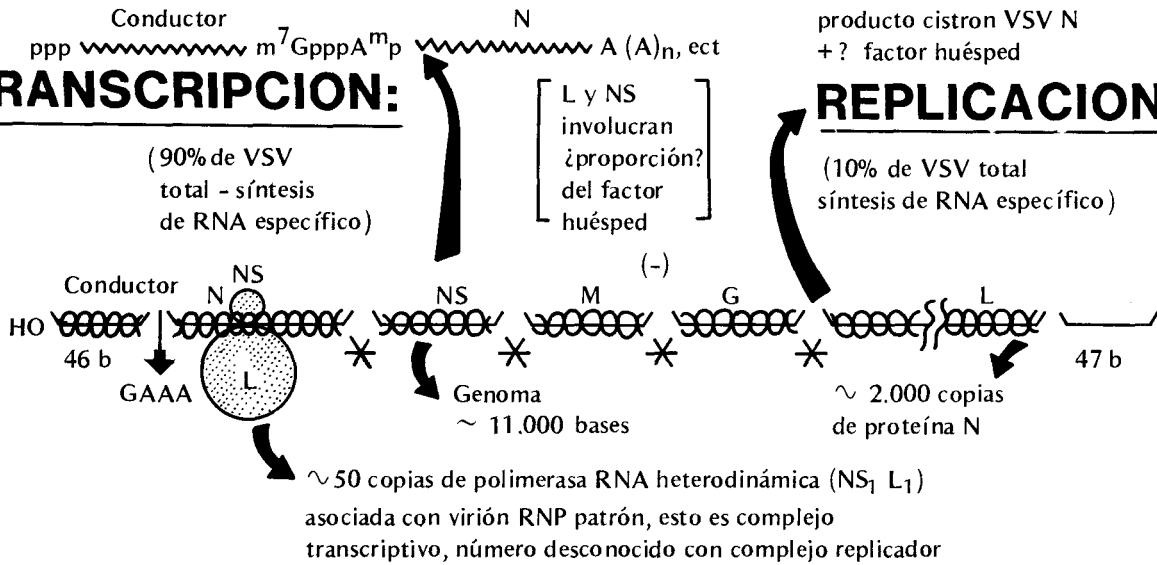
TRANSCRIPCIÓN:

(90% de VSV total - síntesis de RNA específico)

Necesita síntesis de producto cistron VSV N + ? factor huésped

REPLICACIÓN

(10% de VSV total síntesis de RNA específico)



* - $UT^G_C A$ - Señal acción de Poli A + 2 base separadora intercistronica no transcrita

INFLUENZA:

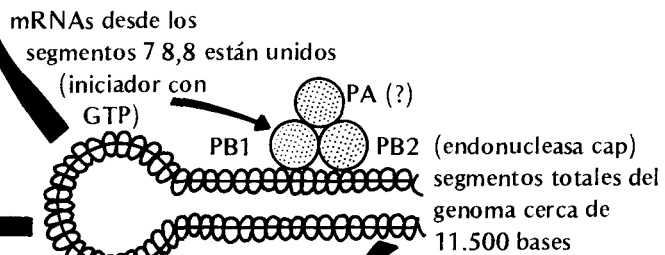
Modelado desde la segunda base en todos los segmentos genómicos



Cap + 10 - 13 bases desde el huésped en RNA en el núcleo puede ser principiada con ApG.

15 - 22 nucleóticos no transcritos desde la enzima

TRANSCRIPCIÓN



REPLICACIÓN

Exige síntesis de proteína
 ? enzima comprometida
 ? unión de RNPs durante la síntesis replicadora
 ? asiento en la célula

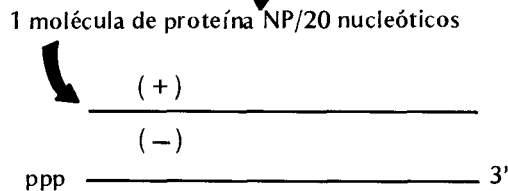


Fig. 1. Esquema que representa la transcripción y la replicación del virus de la Estomatitis Vesicular (VSV) y el de la Influenza.

da en los influenzavirus donde se trata de un heterotrímero de dos subunidades básicas y una ácida, cada una de ellas con un peso molecular de unos 80.000 (1-3).

La más profundamente estudiada de las RNA-polimerasas de virus de hélice negativa es la de los virus de la estomatitis vesicular (VSV) y de los de virus influenza, en los que se trata de enzimas multifuncionales que comparten características durante los ciclos replicativos virales.

VSV:

a) **Transcripción:** Ha sido claramente demostrado que la enzima dimérica L1NS1 del VSV requiere de ambas subunidades para cumplir la función de transcriptasa; los productos de esta reacción *in vivo* e *in vitro* son una corta secuencia guía trifosforilada y los cinco mRNA monocistrónicos, cubiertos, metilados y poliadenilados. Existe un acuerdo general en el sentido de que la enzima tiene sitios activos cuya función es adicionar la cubierta y los grupos metil- y poli-adenilar los mRNA. Se ha visto que la activación de la metilación es una de las funciones que reside en la subunidad L; en dos mutaciones de VSV -que se pudo detectar habían ocurrido a nivel del cistron L- no fue posible lograr *in vitro* la metilación de los mRNA del VSV (4). El que la enzima del VSV inicie la transcripción en un sitio 3' de entrada único o el que lo haga también en sitios internos (5-7); el que la enzima sintetice una transcripción grande con procesamiento nucleotídico o se detenga en las cortas secuencias intergénicas y la reinicie al comienzo del siguiente gen, son problemas que todavía no han sido resueltos (6). (ver fig. 1).

b) **Replicación:** La RNA-polimerasa del VSV sufre ciertas modificaciones por mecanismos que todavía no han sido identificados; posiblemente sea un factor del huésped (8-14), la fosforilación de una unidad pequeña y/o un cambio en el número de subunidades de la enzima (15) y una desviación hacia la modalidad replicativa de tal manera que los productos de esta reacción sean copias completas (+) y (-) del genoma que al ser sintetizadas van siendo ensambladas, en partículas RNP que contienen proteínas N, NS y L (16). La modalidad replicativa requiere de la síntesis simultánea de proteínas (17-19) y se necesita como mínimo a la proteína N para poder realizar la reacción *in vitro* (17,

18). Todavía quedan ciertas dudas por aclarar con relación a la naturaleza de los controles de transcripción/replicación, el papel de los niveles de NS en la fosforilación y la composición de transcriptasa versus replicasa.

Influenza

a) **Transcripción.** Durante la modalidad de transcripción la enzima tripartita del virus influenza (PB1-PB2-PA) también recubre, metila y poliadenila los hnRNA del virus, pero esto lo hace mediante la ruptura endonucleolítica del mRNA de la célula huésped (dentro del núcleo) para producir una estructura cobertora de 10 a 13 nucleótidos que son usados para la transcripción primaria (3,20). La transcripción se inicia a nivel de la segunda base de cada segmento genómico (3) y estas reacciones, aparte de las de elongación y finalización/poliadenilación, son llevadas a cabo por la enzima. El proceso de finalización llega a detenerse 15 a 22 nucleótidos antes del extremo 5' del genoma. Ya que la transcripción del virus influenza depende del hnRNA recién sintetizado por la célula huésped, es posible que el proceso pueda ser bloqueado por la actinomicina D.

Es interesante anotar aquí que el Bunyavirus La Crosse tiene una proteína grande (L) que es la RNA polimerasa putativa. Esta enzima utiliza para la transcripción un mecanismo casi similar al descrito para el virus influenza (21).

b) **Replicación:** La replicación del virus influenza depende de la síntesis simultánea de proteínas y es inhibida, como ocurre con todos los virus de hélice negativa, por la cicloheximida. No se sabe cuales subunidades enzimáticas están comprometidas en la replicación, cuál puede ser el sitio de la célula donde ocurre la misma o si la desviación hacia la modalidad replicativa tal vez comprometa una o más de las tres proteínas no estructurales (NS1, NS2 ó M2). En caso de que exista una proteína que modifique la enzima del virus influenza, un posible candidato sería NS1 debido a las siguientes razones: (1) una mutación *ts* en el segmento genético 8, que codifica la síntesis de NS1, produce una disminución de más del 90% en la síntesis del virión RNA (-); (2) NS1 es producida en etapas iniciales del ciclo replicativo y es transportada al núcleo y nucléolo (23) y (3) parece tratarse de una proteína enlazadora de RNA (24).

Con la intención de definir el mecanismo (s) que regula (n) la RNA polimerasa del VSV y del virus influenza, nuestro laboratorio ha seleccionado diversas técnicas. Describiré estos enfoques brevemente y discutiré también nuestras futuras líneas de investigación al respecto.

Replicación *in vivo* e *in vitro* del RNA del VSV:

Cuando iniciamos nuestra investigación sobre los complejos de RNA del VSV lo hicimos con el objeto de estudiar la replicación del genoma viral *in vivo* e *in vitro*. Era sabido que esta reacción sintética dependía de una síntesis proteica simultánea, mientras que la transcripción para formar mRNA no lo era (19). Nuestros estudios iniciales fueron enfocados hacia el proceso de replicación *in vivo* y al seguir esta reacción nos apoyamos en el hecho de que, si se analizaban extractos celulares infectados mediante gradientes de CsCl, todos los productos de la transcripción se encontrarían en la fracción de la cápsula, mientras que los RNA del genoma replicado aparecerían en una banda cuya densidad es de 1,31 gm/ml. Estos estudios establecieron que la tasa de replicación mostraba un pico único a las 4,5 horas postinfección y representaba el 10% de la síntesis de RNA específico para VSV en células Hela infectadas viralmente. Estos experimentos mostraron también que la síntesis del genoma completo y de la hélice representaba un 40% de la síntesis del RNA genómico dos horas postinfección (PI) mientras que, a las 4-6 horas, PI representaba el 15-20%. Estos estudios también demostraron que este virus encapsulado era liberado de la célula infectada en forma de un "estallido" a las 4-7 horas PI (25, 26).

En un esfuerzo para separar las diversas formas de complejos RNP intracelulares (en replicación, en transcripción y los que estaban próximos a ser empacados en viriones) examinamos diversos métodos que empleaban la separación basada en tamaño, en la densidad, etc. Finalmente, comprobamos que los gradientes lineales de renografina separarían, al menos "bioquímicamente", los complejos RNP transcriptivos y replicativos. Es decir, en las células infectadas los complejos replicativos marcados con 3H-Uridina quedaban intactos y aparecían en la banda como un pico claramente agudo, mientras que las moléculas nacientes de mRNA se disociaban del elemento transcriptivo y se localizaban en la porción superior de los gradientes. Demostramos que las hélices replicativas

nuevas eran resistentes a la RNA-asa, es decir, eran incluidas dentro de los complejos RNP durante la síntesis siendo su polaridad negativa en un 85% tal y como habían predicho nuestros anteriores estudios.

Otras investigaciones con el empleo de los gradientes de renografina demostraron que estos complejos RNP en formación podían ser "cazados" o incluidos dentro de complejos genómicos completos. Aún más, su síntesis podía ser bloqueada inhibiendo la síntesis proteica mediante el uso de la cicloheximida, tal y como uno podría predecir que ocurriría con los complejos en replicación (27).

Posteriormente, examinamos cuáles eran las proteínas VSV-específicas que eran ensambladas en los complejos RNP nacientes durante su síntesis; pudimos señalar que las tres proteínas RNP (L, NS y N) eran co-ensambladas. Contrariando previas presunciones, estos estudios también demostraron que existía una agrupación intracelular de estas proteínas capaces de apoyar 20-30 minutos de replicación después de adicionar cicloheximida (16).

Logramos establecer, entonces, un método que permitía diseminar partículas RNP de VSV para microscopía electrónica (ME) usando EDTA y asumimos que, si habíamos podido aislar complejos replicativos "intactos" usando gradientes de renografina, podríamos identificar tales complejos bajo el ME usando el tratamiento con EDTA. De hecho lo logramos y pudimos identificarlos como complejos de 10 x 4000 nm que permanecían intactos después de ser desenrollados por acción del EDTA. Muchos complejos replicativos con RNP nacientes lucían como estructuras idénticas a una horquilla con dimensiones de 20 x 2000 nm. No fue posible encontrar elementos RNP lineales desenrollados con hélices sencillas nacientes. Todos parecían existir en la forma de horquilla ya descrita (28,29).

Después de completar los estudios *in vivo* de la replicación del VSV, empezamos a establecer un sistema para analizar la replicación *in vitro* del RNA del VSV. Pensábamos que debíamos acoplar la transcripción del VSV a un sistema traductor capaz de producir las proteínas del virus dirigiendo así la replicación mediante complejos replicativos intracelulares. El primer sistema que utilizamos (un S10 obtenido a partir de células HeLa infectadas por VSV) fue exitoso y produjo un bajo nivel de replicación *in vitro*. El RNA com-

pleto de hélices (+) y (-) fue ensamblado *in vitro* en partículas RNP, las cuales eran resistentes a la RNA-asa, aparecían en las bandas de CsCl de 1,31 g/cc de densidad y contenían primordialmente RNA de hélice (-) y un poco de proteína N. El sistema S10 infectado no era inhibido por acción de la cicloheximida debido al hecho de que los extractos de células infectadas contenían grupos de las proteínas necesarias para mantener una replicación suficiente hasta para 60 minutos de síntesis *in vitro* (30).

Posteriormente, llevamos a cabo la misma reacción de replicación *in vitro* con células HeLa S10 no infectadas, empleando complejos de replicación de origen intracelular como fuentes de material. En este sistema, en el que no existían las proteínas preformadas, pudimos demostrar de nuevo la síntesis de moléculas completas de RNA (+) y (-) que eran ensambladas dentro de las partículas RNP. Este sistema era completamente inhibido por acción de la Pactamicina u otros inhibidores de la síntesis proteica (31).

Obtuvimos un antisuero monoespecífico -mediante la inoculación en ganglios poplíteos de conejo- de cada uno de los productos derivados de los genes del VSV incluyendo las proteínas L y NS de la transcriptasa viral. Usando nuestro sistema acoplado *in vitro*, que ahora dependía de síntesis proteica, pudimos establecer directamente si L y/o NS también estaban comprometidas en la replicación. Primero comprobamos la monoespecificidad del suero (32) y luego comparamos los efectos de estos sueros sobre la capacidad de las RNP intracelulares para transcribir mRNA con los efectos sobre la replicación que genera RNA completos (32,33).

Los resultados que obtuvimos fueron los siguientes:

1. El anti-NS inhibía totalmente tanto la replicación como la transcripción;
2. El anti-L estimulaba, por un lado, de 1,5 a 2 veces la replicación (por mecanismos que aun no son claros) mientras por el otro inhibía la transcripción por completo;
3. El suero anti-N no tenía ningún efecto sobre la transcripción pero inhibía totalmente la replicación presumiblemente debido a la depleción de la proteína N necesaria para mantener el ensamblaje ribonucleoproteico.

La proteínasina asociada al virión y la fosforilación de las proteínas NS:

Iniciamos también ciertos estudios tendientes a analizar si la fosforilación de la pequeña subunidad enzimática NS representaba algún papel en la regulación enzimática. Había sido previamente demostrado que el dATP podía servir como un sustrato apropiado para la proteínasina asociada al VSV, pero no así para la transcriptasa (34). Los autores de este último artículo sugerían que la fosforilación de proteínas RNP era un evento necesario para activar la transcriptasa viral. Para estudiar la relación entre la fosforilación de L y NS y la función de la transcriptasa, seguimos estos parámetros en reacciones *in vivo* que contenían RNP purificadas. Pudimos encontrar que existía una liberación permanente de NS fosforilada proveniente de las RNP durante la reacción de la cinasa hasta por un período de 2 horas. Tratando de inhibir específicamente la proteínasina, utilizamos TLCK, un inhibidor de proteasas, del cual se había informado que inhibía una cinasa muscular del conejo (35) y demostramos que este compuesto inhibía completamente la cinasa y la transcriptasa del VSV. Estos estudios sugerían fuertemente -aunque no establecían el requerimiento- que la fosforilación de L y/o NS era un requisito para activar la transcripción (36).

Por cuanto estos experimentos con las reacciones *in vivo* con cinasas no eran concluyentes, nos pareció que un análisis directo del número de sitios de fosforilación y de su localización en la proteína NS sería algo más definitivo, especialmente si teníamos en cuenta que ya había sido publicada la secuencia total de NS (37). Iniciamos, pues, un esfuerzo mayor para obtener una enzima (L, NS¹) y un complejo RNP-P completamente puros con los cuales pudiéramos realizar estudios de reconstitución *in vitro* de la actividad de la transcriptasa y de la proteína NS. Un resultado de nuestra purificación enzimática fue que mientras obteníamos una mayor cantidad de los elementos purificados, la actividad de la proteínasina disminuía hasta desaparecer. Posteriormente, pudimos demostrar que la actividad de cinasa asociada al virión no era aislada o co-purificada en ninguna proteína específica del VSV, ni era precipitada por ningún antisuero contra las proteínas del VSV y que la traducción *in vitro* de los mRNA del VSV no producía un incremento en la actividad de cinasa. Llegamos a la conclusión de que la cinasa del virión era una proteína de la célula huésped (38).

Análisis estructural de la proteína NS.

De la secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia del gene que en cDNA codifica la síntesis de NS (37), dedujimos que esta subunidad polimerasa era una proteína altamente ácida, de aproximadamente 28.000 daltons. Rose y sus colegas sugirieron que probablemente esta propiedad ácida hacía que NS se uniese muy pobremente a SDS y mígrase hacia SDS-PAGE como si tuvieran un peso molecular de 48.000. Por ello analizamos a NS en pH bajo en geles de SDS-ácido y geles de CTAB -un detergente de carga positiva- y en ambos casos NS migró a un punto cercano a su peso molecular de 28.000 (39) confirmando la hipótesis de Gallione et al. (37). La secuencia de aminoácidos también indicaba que la ruptura con bromuro de cianógeno (CNBr) produciría un péptido aminoterminal ácido (PM = 18.000) y de gran tamaño. Este péptido fue ulteriormente demostrado después de usar CNBr, pudiendo demostrarse que migraba hacia SDS-PAGE con un peso molecular de 18.000. Este péptido aminoterminal contenía la mayoría -si no la totalidad- de los residuos de fosfato de la proteína NS (39).

Demostramos también que los péptidos trípticos derivados de NS radiomarcada con ^{35}S -metionina o cisteína y ^3H -lisina, arginina, ácido aspártico o ácido glutámico, al ser posteriormente analizados con HPLC no coincidían con la secuencia de aminoácidos que habían sido publicadas como derivados del cDNA. Por ejemplo, nuestros datos mostraban que ninguno de los péptidos con Met tampoco contenían Cis, mientras que la secuencia predicha aseguraba la existencia de un péptido que contenía Met-Cis. Esto, aparte de otras discrepancias inexplicables, nos llevaron a concluir que la secuencia de aminoácidos publicada era incorrecta; esto es, existían algunos errores en la secuencia del cDNA que posiblemente se encontraban en la porción terminal 3' del gene.

Desde el momento en que este trabajo sobre la proteína NS indicó que era muy factible la existencia de un error en la secuencia del cDNA que había sido publicada o que posiblemente algún segmento del cDNA usado en la clona no provenía de NS, hemos comenzado a obtener la clona de NS y secuenciar el gen completo. Obtuvimos un oligonucleótido generador sintético de 12 nucleótidos (5'. T-G-G-A-T-A-A-T-C-T-C-A.. 3') proporcionado por el doctor Clay Naeve del Centro de Investigaciones Pediátricas San Judas, de Mem-

phis, Tennessee. El primer nucleótido del generador corresponde al residuo U del codón AUG de iniciación en el gene de NS. La primera síntesis de una cadena de cDNA fue realizada en el genoma RNA del VSV obtenido de virus purificado e hibridizado con el generador y la reverso-transcriptasa viral (RT). Posteriormente, sintetizamos cDNA para todos los mRNA del VSV usando generadores del tipo oligo-dT. Después de seleccionar todos los cDNA con más de 600 nucleótidos, hibridamos las dos poblaciones antes mencionadas y sintetizamos la segunda hélice usando un fragmento Klenow. Estos dscDNA de más de 600 nucleótidos fueron clonados mediante la inserción de cDNA del gen NS usando un vector de expresión -pUC13 - (40-43), el cual fue posteriormente amplificado en *E. coli* JM105. Tenemos entonces cinco transformadores, todos los cuales pueden expresar altos niveles de NS después de la inducción. Ahora trataremos de expresar el gen NS en una base eucariótica usando el plásmido seleccionable construido por Genetech (44) que contiene un gen de DHFR.

Microscopía inmunoelectrónica del RNP de VSV.

Recientemente hemos sido capaces de cuantificar el número y localización de las subunidades de RNA polimerasa (L, NS) incluídas en el complejo RNP del VSV. Para ello hemos utilizado nuestro antisuero monoespecífico acoplado a esferas áureas ($\sim 190 \text{ \AA}$) (28) que contienen bien sea una IgG obtenida en cabras y con actividad anticonejo o bien proteína A de *Staphylococcus*. Como se observa en la figura 2, los complejos RNP del VSV pueden ser visualizados fácilmente después del tratamiento con EDTA. Cuando se usan esferas áureas o proteína A de *Staphylococcus* después de una reacción con antisueros anti-L, uno puede fácilmente observar y contar las esferas unidas a las subunidades de la enzima L (fig. 3). Por este medio pudimos determinar que existían un mínimo de 60 subunidades de NS y 30 de L por cada complejo RNP. Estos estudios han sido extendidos ahora a complejos activamente replicantes y transcritores.

Influenza A.

Simultáneamente con nuestros estudios en relación a la replicación *in vitro* del VSV, estamos comenzado a examinar los mecanismos comprometidos en la replicación del virus influenza tipo A, con la intención de establecer si la enzima viral

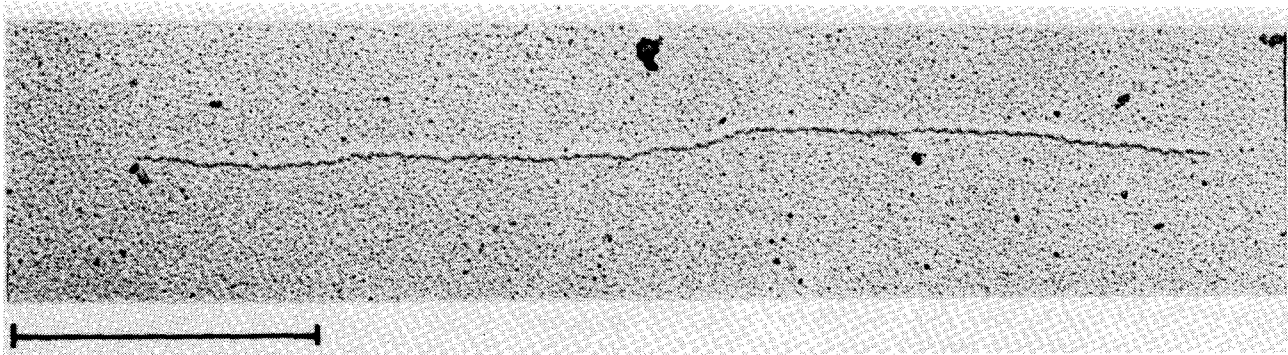


Fig. 2. Complejos ribonucleoproteicos del VSV después de ser tratados con EDTA.

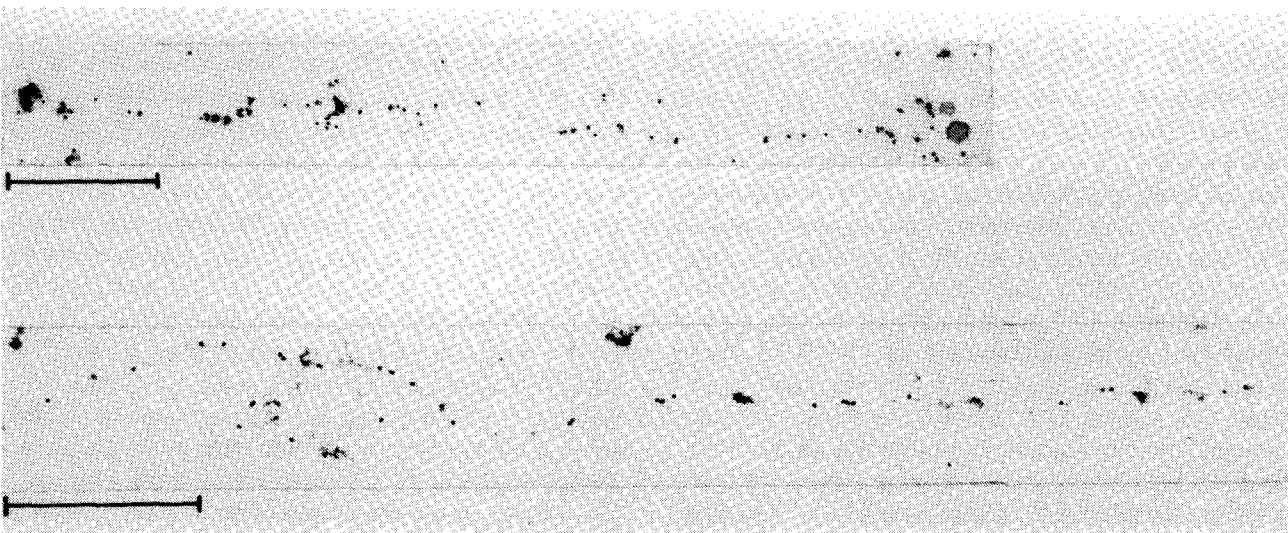


Fig. 3. Esferas aureas unidas a las subunidades de la enzima L después de aplicar antisueros anti-L.

(PB, PB₂, P1) que transcribe el mRNA, es también la enzima que replica el genoma del virus. Estamos enfocando este problema inicialmente mediante el establecimiento de un sistema de replicación *in vitro* similar al que usamos para el VSV, excepto que el sistema del virus influenza deberá tener algunas ventajas adicionales por cuanto la transcripción y replicación de este agente pueden ser inhibidas diferencialmente. Ha sido demostrado que la transcripción del virus influenza puede ser inhibida por la Actinomicina-D debido a que esta reacción depende de la transcripción activa de la células huésped (hnRNA) como fuente de las cubiertas que necesita el mRNA viral y como generador. La replicación de este agente es inhibida por la cicloheximida.

Recientemente, Krug y sus colegas (46) demostraron muy claramente que la transcripción del virus influenza se realiza en el núcleo de la célula infectada; sin embargo, el sitio de la replicación del

RNA viral no ha sido definido todavía. Puesto que la replicación depende de la síntesis paralela de proteínas, nosotros hemos asumido que esta dependencia tiene unas bases similares a las que hallamos para el VSV, es decir, que durante la modalidad replicante de la síntesis de RNA, las hélices (+) y (-) eran ensambladas dentro de las partículas RNP que contenían la ribonucleoproteína estructural que, en el caso del virus influenza, es la NP. Sin embargo, esto no ha sido demostrado todavía.

No obstante, ha sido bien establecido que el genoma del virus influenza está envuelto o agrupado dentro de estructuras ribonucleoproteicas de la célula infectada durante la replicación en algún momento posterior a ésta, y si esto ocurre en el núcleo, entonces estas estructuras son transportadas al citoplasma en forma de 8 discretas estructuras de diferentes tamaños que contienen los 8 RNA del genoma viral. Se ha demostrado también que,

a diferencia del VSV, el RNA de estos complejos RNP es sensible a las RNAasa (47-49) y los mencionados complejos no son estables en CsCl. Usando técnicas de hibridación RNA/RNA, mediante mRNA y/o muestras de RNA del virión, se ha demostrado que los productos replicativos intracelulares existen en una relación de 90 (-)/10(+) y que muy poca hélice (+) es incluida finalmente en los viriones (50). El porcentaje de síntesis total de RNA en la célula infectada que representa la replicación viral no ha sido establecido (3), aunque Hay et al. (51) estimaron que se acercaba a un 10% del total.

Hemos establecido un sistema *in vitro* de síntesis de RNA que se deriva de extractos nucleares de células HeLa infectadas con virus influenza, el cual sintetiza RNA virales específicos de ambos tipos de hélice (+ y -); es decir, estos extractos nucleares muy posiblemente -como ocurrió con el VSV- son transcriptores y replicadores. Para determinar con mayor precisión la cantidad de RNA sintetizado *in vitro* que fue producto de la replicación y cuanto lo fue de la transcripción, hemos sintetizado copias completas de cDNA de doble hélice procedente de los 8 segmentos del genoma viral, los cuales han sido insertados en ambas orientaciones en la forma replicativa del bacteriófago M13 (40-43). Esta estrategia proporcionará grandes cantidades de secuencias (+) y (-) provenientes de cada uno de los segmentos del genoma viral que han sido introducidos como DNA de hélice única en las partículas del fago en mención. Con estas muestras de cDNA de una sola hélice, podemos cuantificar fácilmente los productos obtenidos en nuestro sistema *in vitro* de replicación por hibridación.

Con estos recursos podemos fácilmente preguntarnos el sitio preciso de replicación viral, transporte de las RNP del núcleo al citoplasma, etc.

Mediante dos métodos diferentes estamos obteniendo antisueros del conejo, específicos para las tres subunidades enzimáticas y contra NS1, para poder determinar cual de las tres subunidades de la transcriptasa viral (PB1, PB2, PA) está comprometida en la replicación y para definir si NS1, un

producto genético viral temprano, desempeña un papel regulador o modulador en la síntesis del RNA viral.

El primer enfoque es similar al que empleamos para producir IgG anti-enzimas del VSV, es decir, estamos purificando las subunidades enzimáticas del influenzavirus y el NS1 mediante técnicas de química proteica normalizadas para luego inyectarlas (5-10 ug) en nódulos linfáticos poplíteos de conejo.

El segundo enfoque que estamos empleando utiliza un sintetizador de péptidos Beckman, mediante el cual sintetizamos oligopéptidos cortos derivados de secuencias conocidas de aminoácidos provenientes de proteínas virales. Basados en su naturaleza hidrofílica, hemos seleccionado 4 péptidos para la síntesis; ésto lo podemos hacer mediante un programa de computador que analiza la secuencia de aminoácidos de cada proteína en busca de regiones de relativa hidrofobia o hidrofilia. Estos gráficos computarizados fueron suministrados por el Dr. J.V. Maizel, Jr., del Instituto Nacional de Salud y un ejemplo de ellos para la subunidad enzimática PB2 se muestra en la figura 4. Aproximadamente la mitad de la densidad fotográfica en el eje de las ordenadas, es un valor cero arbitrario. Por encima y por debajo de un punto medio se grafica la hidrofilia o hidrofobia relativas [(+) y (-)]. Los valores hidrofílicos para cada aminoácido se encuentran en la parte superior.

Los péptidos sintetizados serán unidos a una proteína transportadora (KLH o BSA), mezclados con adyuvante de Freund completo e inyectados en conejos. Hasta ahora hemos sintetizado dos péptidos de NS1, uno de la región carboxiterminal y otro aminoterminal. El primero de ellos provenía de los residuos 209 a 220 y su secuencia es: NH₂-Asn-Gly-Arg-Pro-Leu-Thre-Pro-Lys-Arg-COOH.

Dos conejos fueron inyectados con el péptido y después de tres aplicaciones ambos antisueros fueron diluidos 1:1000 y pudimos detectar mediante técnicas de ELISA, RIFA o Western blotting hasta 200 nanogramos de los péptidos o de NS1. Actualmente estamos examinando los efectos inhibi-

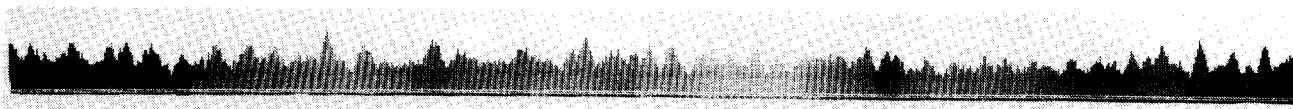


Fig. 4. Esquema del gráfico computarizado de la subunidad enzimática PB2 del virus Influenza A.

torios de estos anti-NS1 en nuestro sistema de replicación *in vitro*.

En resumen, mediante el uso de inmunoelectromicroscopía, péptidos sintéticos, sistemas enzimáticos *in vitro* y técnicas de bioingeniería esperamos obtener información relevante sobre los mecanismos por medio de los cuales esta clase única de enzimas sintéticas de RNA regula y dirige las funciones transcriptiva y replicativa de los RNA-virus de hélice negativa.

Referencias

1. RHABDOVIRUSES. Vols. I - III. D.H.L. Bishop. CRE Press, 1980.
2. CURRENT TOPICS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY. Vol. 105. eds. Cooper et al. Springer-Verlag, 1983. Chapter 1 Stizuss, E.G. and Strauss, J. H.
3. ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY. Vol. 52:467-506, 1983. Lamb, R.A. and Choppin, P.W.
4. PELUSO, R.W. and MOYER S.A. Proc. Natl. Acad. Sci., 80: 3198-3202, 1983.
5. CHANDRA, P.K. and BANERJEE, A.K. Virol., 39:93-103, 1981.
6. EMERSON, S.U. Cell., 31:635-642, 1982.
7. NAEVE, C.E. and SUMMERS, D.F. Replication of negative strand viruses. D.H.L. Bishop and Compans eds. 769-779, Elsevier/North Holland.
8. NOWAKOWSKI, M. et al. J. Virol., 12:1272-1278, 1973.
9. OBIJESKI, J.F. and SIMPSON, R.W. Virol., 57:359-377, 1974.
10. SIMPSON, R.W. and OBIJESKI, J.F. Virol., 57:357-368, 1974.
11. SIMPSON, R.W. et al. Virology, 93:493-505, 1979.
12. THACORE, H.R. and YOUNGNER, J.S. J. Virol., 16:322-329, 1975.
13. THACORE, H.R. and YOUNGNER, J.S. Virology, 56:505-511, 1973.
14. THACORE, H.R. and YOUNGNER, J.S. Virology, 56:512-522, 1973.
15. SCHNITZLEIN, W.M. and REICHMAN, M.E. Virol. 103:123-127, 1980.
16. RUBIO, C. et al. Virology, 105:123-135, 1980.
17. HILL, V. M. et al. Virology, 113:109-118, 1981.
18. HILL, V.M. and SUMMERS, D.F. Virology, 123:407-419, 1982.
19. WERTZ, G.W. and LEVINE, M.J. Virol., 12:253-264, 1973.
20. PLOTCH, S.J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:1618-1622, 1979.
21. PATTERSON. J.L. and KALAKOFFSKY, D. Virol., 49:683-685, 1984.
22. WOLSTENHOLME, A.J. et al. J. Virol., 35:1-7, 1980.
23. KRUG, R.M. and SOEIRO, K. Virology, 64:378-387, 1975.
24. YOSHIDA, T. et al. Virology, 110:81-97, 1981.
25. SIMONSEN, C.S. et al. J. Virol., 31:124-132, 1979.
26. HILL, V.M. et al. Virology, 99:75-83, 1979.
27. SIMONSEN, C.S. et al. J. Virol., 31:494-505, 1980.
28. NAEVE, C.S. et al. J. Virol., 33:856-865, 1980.
29. NAEVE, C.W. and SOMMERS, D.F. J. Virol., 39:764-771, 1980.
30. HILL, V.M. et al. Virology, 113:109-118, 1981.
31. HILL, V.M. et al.
32. HARMON, S.A. and SUMMERS, O.F. Virology, 120:194-204, 1982.
33. HILL, V.M. and SUMMERS, D.F. Virology, 123:407-419, 1982.
34. WATANABE, Y. et al. F.E.B.S. Lett, 41:331-334, 1974.
35. KUPFOR, A. et al. Proc. Natls. Acad. Sci. U.S.A., 76:3073-3077, 1979.
36. WITT, D. and SUMMERS, D.F. Virology, 197:34-39, 1980.
37. GALLIONE, C.J. et al. J. Virol., 39:529-535, 1981.
38. HARMON, S.A. et al. J. Biol. Chem, 258:15283-15290, 1980.
39. MARNELL, L. and SUMMERS, D.F. In Press.
40. MESSING, J. et al. Nucl. Acids. Res., 9:309-322, 1981.
41. MESSING, J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74:3642-3646, 1977.
42. MESSING, J. NIH Publication No. 78-99.
43. MESSING, J. and VIEIRA, J. Gene, 19:269-276, 1982.
44. SIMONSEN, C.S. and LEVINSON, A.D. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:2495-2499, 1983.
45. FRENZ, G. Nature Physical Science, 241:20-22, 1973.
46. HERZ, C. et al. Cell, 26:391-400, 1981.
47. DUESBERG, P.H. J. Molec. Biol. 42:485-499, 1969.
48. JENNINGS, P.A. et al. Cell, 34:619-677, 1983.
49. KINGSBURY, D.W. and WEBSTER, R.G. Virol., 4:219-225, 1969.
50. PONS, M.W. Virology, 46:149-160, 1971.
51. HAY, A.J. et al. Virol., 83:337-355, 1977.

52. HOPP, T.P. and WOODS, K.R. Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 3824-3828, 1981.
53. SHINNICK, T.M. et al. Biochem. 37:425-446, 1983.
54. SUTCLIFFE, J.C. et al. Science., 219:660-666, 1983.

Agradecimientos

Esta investigación fué posible gracias a los auspicios del Instituto Nacional de Salud E.U (No. 5 RO1 A1 12316) y de la Fundación Nacional de las Ciencias E.U (No. PCM-81-10986), E.U.
