Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Instituto de Bioquímica y Biología Molecular

**ANALISIS MOLECULAR DEL GEN DE LA
PROTEINA DE LA NUCLEOCAPSIDE DEL
VIRUS JUNIN.**

**Secuencia nucleotídica, expresión
y mecanismos de transcripción.**

Rolando Víctor Rivera Pomar

Tesis Doctoral

La Plata, 1991

876
DONACION.....
Fecha. 04 MAR. 1997 ...
Inv. B.....Inv.....B. 54543

El presente trabajo de tesis, para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Bioquímicas, ha sido realizado en el Area de Química Biológica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Profesor Adjunto de Química Biológica Dr. Víctor Romanowski.

Esta tesis fue realizada como becario de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires

Parte de la investigación aquí presentada fue subsidiada por el Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (incluida en el proyecto PID-89)

En las épocas difíciles, la Fundación Humbert Lan me otorgó un subsidio de techo y comida.

El capítulo correspondiente al clonado y secuenciación fue hecho en colaboración con el Prof. Pablo Daniel Ghiringhelli, quien realizó gran parte del clonado y la secuenciación por el método químico. Los resultados del capítulo 3 fueron obtenidos en conjunto. El análisis de dichos resultados en esta tesis se refiere principalmente a las características de la proteína N que se estudian en los capítulos posteriores. Otros aspectos del análisis de la secuencia a partir de los datos que se presentan aquí serán analizados en la tesis que presentará P.D. Ghiringhelli.

La construcción del gen N del virus Junín utilizada en el capítulo de expresión fue realizada mayoritariamente por la Lic. Eva María Manzella. Los experimentos que incluyeron la reacción de polimerasa en cadena (PCR) se realizaron en colaboración con el Lic. Mario E. Lozano.

A todos ellos estoy muy agradecido.

Parte de esta tesis ha sido publicada tal como se detalla:

P.D. Ghiringhelli, R.V. Rivera Pomar, N.I. Baro, M.F. Rosas, O. Grau & V. Romanowski (1989)

Nucleocapsid Protein Gene of Junin Arenavirus.

N. Acids Res. 17, 8001.

R.V. Rivera Pomar, E.M. Manzella, P.D. Ghiringhelli, O. Grau & V. Romanowski (1991)

Patterns of transient expression of arenavirus nucleocapsid protein gene in transfected cells.

Microscopía Electrónica y Biología Celular (en prensa)

P.D. Ghiringhelli, R.V. Rivera Pomar, M.E. Lozano, O. Grau & V. Romanowski (1991)

Molecular organization of the Junín virus S RNA.

J.Gen.Virol. (en prensa)

Para Graciélita

AGRADECIMIENTOS

A mi director, Dr. Víctor Romanowski, por todo lo que me ha dado a lo largo del tiempo que pasé en el laboratorio en el aspecto académico (Víctor sabe una enormidad de Biología Molecular y tiene un criterio científico como pocas veces vi) y muy particularmente por su calidad humana, su bien entendida modestia, su honestidad y su sentido ético de la ciencia (Por supuesto, este párrafo es la única parte de la tesis que Víctor no pudo ver, ya que seguramente no me hubiera permitido escribir que le agradezco que sea una persona excepcional).

A la facultad de Ciencias Exactas y muy especialmente al Departamento de Ciencias Biológicas por su apoyo para la realización y presentación de esta tesis.

A Angel Stoka, Luis Quesada y Oscar Grau, con quienes comencé mis tareas científicas y contribuyeron a mi formación. A.S., como mi primer jefe, me enseñó las bases de la investigación científica: el análisis de los resultados. Con L.Q. aprendí que hay que pensar libremente y sin miedo... hasta las ideas más disparatadas! y buscar en ellas más ideas nuevas; por él guardo un gran cariño. O.G. ("El Jefe") me ofreció comenzar con la biología molecular de los virus y me dió mi lugar de trabajo de los últimos años, donde pude discutir y pelearme con él permanentemente (...y nos tenemos simpatía, ¿o será homeopatía?).

A Alberto Sarachu (*in memoriam*) y Gabriel Favelukes, por sus aliento, consejos y acotaciones, siempre sagaces y divertidas.

A todos mis compañeros del Area de Química Biológica y Biología Molecular (hoy flamante Instituto de Bioquímica y Biología Molecular) con quienes la pasé muy bien: Mario y Eva (mis compañeritos de laboratorio), César, Daniel (porque es bueno ma ha ayudado mucho y sabe de computadoras), Tony y Luis (porque son más buenos que el pan), Graciela Zanassi, Daniel Grasso y Laura, Aníbal de Flores, Carolina Barrios, Marcelo Giménez, Ramón El Optimista y Mario Donati El Agradable. Al grupo técnico: Cati, Aldo, Luis y Guillermo. Al grupo de todo servicio: Carlitos Illeano. Mención muy especial para Silvia Moya, que tanto me ayudó con esta tesis y todos los trabajos que requirieron procesador de palabras (extensivo a Carolina, que tanto hizo para que esta tesis se pudiera tipear e imprimir)

A la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas (Alberto Fossati, Carlos Rubbi y su mamá, Norberto Zwirner y Fernando Chirido), que estuvieron siempre dispuestos para ayudarme y enseñarme en cuanto cuestión pudieron y porque son muy buenos muchachos.

Al Dr. Eric Hunter (Universidad de Alabama en Birmingham, EE.UU.), por sus consejos en los primeros experimentos de expresión de genes.

Al Dr. Oscar Burrone (ICGB, Trieste, Italia), por el plásmido pKG4 y por sus consejos.

Al Dr. Jeff Engler (Universidad de Alabama en Birmingham, EE.UU.), por el plásmido p91023.

Al Dr. David H. L. Bishop (NERC Institute of Virology, Oxford, Inglaterra), por los anticuerpos monoclonales contra el virus LCM.

Al Dr. Anthony Sanchez y Dominique Pifat (USAMRIID, Maryland, EE.UU.), por los anticuerpos monoclonales contra el virus Junín.

A la Dra. M. De Mitri (Instituto Nacional de Microbiología "Carlos Malbrán"), por los anticuerpos policlonales contra el virus Junín.

Al Lic. Miguel Reigosa, por la línea celular HeLa que gentilmente me cedió para los experimentos de expresión.

Al Dr. Mario Burgos, un caballero, con quien compartí una amable y provechosa estadía en su laboratorio del Instituto de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina (Universidad de Cuyo), por sus enseñanzas y consejos en el campo de la inmunomicroscopía óptica y electrónica

Al Centro de Investigaciones de Fermentaciones Industriales (CINDEFI), por permitirme el uso del microscopio de fluorescencia.

Al Laboratorio de Inmunogenética (Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires) por permitirme el uso del fotomicroscopio invertido.

A todos mis amigos (Macuco, Willi, La China, El Ruso, Bochita, El Osito, Javier, Sergio, Sergio, El Coco) que en mayor o menor medida hicieron posible que llegara hasta aquí.

A mi familia, que tanto me ha soportado.

A Groucho Marx, mi muso inspirador. Todas las hipótesis que presento en esta tesis son de su exclusiva autoría.

INDICE

	Página
1. INTRODUCCION	
Estructura del virión	3
Características fisicoquímicas de las partículas virales	5
Proteínas virales	6
Glicoproteínas	6
Nucleocápside	9
Proteína L	11
Proteína Z	12
Genoma y estrategia de codificación	13
Partículas defectivas e interferencia viral	16
Infecciones persistentes	17
Citopatogenicidad	18
Virus con genoma de RNA negativo	19
2. MATERIALES Y METODOS	
I. MATERIALES	21
I.1.1. Productos químicos	21
I.1.2. Material radiactivo	21
I.2.1. Líneas celulares	22
I.2.2. Virus	22
I.2.3. Cepas bacterianas	23
II. METODOS DE CULTIVO	23
II.1. Cultivo de células	23
II.2.1. Propagación de virus	24
II.2.2. Titulación de virus	24
II.2.3. Purificación de viriones	25
III. METODOS DE CLONADO Y SECUENCIACION	26
III.1.1. Extracción de RNA de viriones	26
III.1.2. Extracción de RNA de células infectadas	26
III.2. Síntesis de cDNA	27
III.2. Clonado de cDNA en plásmidos	27
III.3.1. Transformación de bacterias	27
III.3.2. Selección de recombinantes	28
III.3.3. Subclonado de recombinantes	29

III.4. Preparación de plásmidos	.30
III.4.1. Minipreparaciones	.30
III.4.2. Maxipreparaciones	.30
III.4.3. Maxipreparaciones para transfecciones celulares	.30
III.4.4. Preparación de DNA de simple cadena del fago M13	.32
III.5. Secuenciación de DNA	.32
III.5.1. Método químico	.32
III.5.2. Método de terminación de cadenas	.32
III.5.2.1. Sobre DNA de simple cadena	.32
III.5.2.2. Sobre DNA de doble cadena	.32
III.5.3. Análisis de las secuencias	.33
III.6. Preparación de sondas radiactivas de DNA	.33
IV. METODOS DE ESTUDIO DE EXPRESION DE GENES CLONADOS	.33
IV.1. Transfecciones celulares transientes	.33
IV.1.1. Método de DEAE-dextrano	.33
IV.1.2. Método de precipitación con fosfato de calcio	.34
IV.1.3. Lipofección	.35
IV.2. Transfecciones celulares estables	.35
IV.3.1. Determinación de la funcionalidad de los vectores de expresión	.36
IV.3.2. Determinación de la eficiencia de transfección	.36
IV.4. Análisis de los productos de expresión	.38
IV.4.1. Detección de proteínas virales por inmunofluores- cencia	.38
IV.4.2. Caracterizaicón de proteínas virales	.39
IV.4.2.1. <i>Western blot</i>	.39
IV.4.2.2. Inmunoprecipitación	.39
IV.5. Análisis de los productos de transcripción	.40
V. METODOS DE ANALISIS DEL RNA	.40
V.1.1. Análisis de RNA por electroforesis	.40
V.1.2. Detección de RNAs virales por <i>Northern blot</i>	.41
V.2. Preparación de transcriptos <i>in vitro</i>	.41
V.3. Estudio de los extremos 5'	.42
V.3.1. Análisis por primer extensión	.42
V.3.2. Clonado del extremo 5' por amplificación de DNA por reacción de polimerasa en cadena (PCR)	.43
V.4. Estudio de los extremos 3'	.45
V.4.1. Ensayo de protección a RNasas	.45

3. CLONADO Y SECUENCIACION DEL GEN DE LA PROTEINA DE LA NUCLEOCAPSIDE	
3.1. Crecimiento del virus Junín en células BHK-21 y preparación de RNAs de viriones	46
3.2. Preparación de cDNA a partir de RNA de viriones	46
3.3. Análisis de la secuencia de los primeros 1849 nucleótidos del extremo 3' del RNA S viral	51
3.4. Secuencia primaria de la proteína N	54
3.5 Comparación de la proteína N del virus Junín con otros arenavirus	61
3.6. Región no codificante posterior (<i>downstream</i>) al marco de lectura abierto del gen N	64
3.7. Región no codificante previa (<i>upstream</i>) al marco de lectura abierto del gen N	65
3.8. Discusión	65
3.9. Conclusiones	72
4. EXPRESION DEL GEN N EN CELULAS EN CULTIVO	
4.1. Construcción de los plásmidos recombinantes	73
4.1.1. Construcción del gen N de LCM	73
4.1.2. Construcción del gen N del virus Junín	75
4.2. Expresión transiente en líneas celulares	78
4.3. Nivel de expresión del gen N	78
4.4. Caracterización del producto expresado	79
4.5. Análisis del producto de transcripción	83
4.6. Patrón de expresión del gen N	83
4.7. Discusión	87
Conclusiones	88
5. EFECTOS DE LA EXPRESION DEL N EN CELULAS EN CULTIVO	
5.1. Efecto de la expresión de N en células transfectadas	90
5.2. Efecto de la proteína N en la replicación viral	95
5.3. Discusión	97
5.4. Conclusiones	99

6. TRANSCRIPCION DEL GEN N	
6.1. Identificación de los transcriptos derivados del gen N	100
6.2. Análisis de la transcripción del gen N en presencia y ausencia de inhibidores de la síntesis proteica	100
6.3. Análisis de las señales de terminación	102
6.4. Análisis de los extremos 5'	108
6.5. Discusión	117
6.6. Conclusiones	125
7. CONSIDERACIONES GENERALES	127
8. BIBLIOGRAFIA	129
APENDICE 1: Soluciones y medios utilizados	153
APENDICE 2: Plásmidos	154
APENDICE 3: Síntesis de nucleótidos radiactivos.	155
APENDICE 4: Tabla comparativa de aminoácidos	156

ABREVIATURAS

DNA	ácido desoxirribonucleico
RNA	ácido ribonucleico
rRNA	ácido ribonucleico ribosomal
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
pb	pares de bases
kpb	kilopares de bases (1000 pares de bases)
ATP	trifosfato de adenosina
CTP	trifosfato de citosina
GTP	trifosfato de guanosina
UTP	trifosfato de uridina
dATP	trifosfato de desoxiadenosina
dCTP	trifosfato de desoxicitosina
dGTP	trifosfato de desoxiguanosina
dTTP	trifosfato de desoxitimidina
NTP	trifosfato de nucleósido (sin especificar)
RNasa	ribonucleasa
EDTA	etilendiaminotetraacetato de sodio
TRIS	Tris(hidroximetil)amino metano
BES	(ácido N,N-bis[2-hidroxietil]-2-aminoetanosulfónico; ácido 2-[bis(2-hidroxietil) amino] aminoetanosulfónico)
HEPES	ácido N-[2-hidroxietil]piperazino-N'-etanosulfónico
MOPS	ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico
PIPES	(ácido piperazino-N,N'-bis[2-etanosulfónico]; ácido 1,4-piperazino dietanosulfónico)
SDS	dodecil sulfato de sodio
PEG	polietilen glicol
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosido
IPTG	isopropil tiogalactósido
PM	peso molecular
Da	Dalton: unidad de peso molecular
kDa	kilo Dalton (1000 Da)
M	molar
log	logaritmo base 10
mM	milimolar
μ M	micromolar
mg	miligramo
μ g	microgramo
ng	nanogramo
ml	mililitro
μ l	microlitro
rpm	revoluciones por minuto
Xg	aceleración de la gravedad
cpm	cuentas por minuto

μCi	micro Curie
DO	densidad óptica
UV	ultravioleta
cél.	célula
ufp	unidad formadora de placas
mdi	multiplicidad de infección

ABREVIATURAS DE LOS GENOTIPOS BACTERIANOS

hsdR	Endonucleasa de restricción de <i>E. coli</i> . La ausencia de esta actividad permite la introducción de DNA de distintas fuentes excepto <i>E. coli</i> .
mcrA	Sistema de restricción de <i>E. coli</i> . La mutación evita la restricción de DNA metilado de la secuencia 5'G [*] C ^r C (*metilado).
mcrB	Sistema de restricción de <i>E. coli</i> . La mutación evita la restricción de DNA metilado de la secuencia 5'AG [*] CT (*metilado).
mrr	Sistema de restricción de <i>E. coli</i> . La mutación evita la restricción de DNA metilado de la secuencia 5'G [*] ANTC o CTGC [*] AG (*metilado).
endA	Endonucleasa I específica de DNA. La mutación mejora el rendimiento y producción de DNA de minipreparaciones de plásmidos.
gyrA	Girasa de DNA subunidad A; resistencia o sensibilidad a ácido nalidíxico.
<i>lacI</i>	Proteína represora del operón <i>lac</i> . El producto del gen del mutante <i>lacI</i> ^q es una proteína represora de alta afinidad de <i>binding</i> .
<i>lacZ</i>	β -D-galactosidasa para el uso de lactosa. Las células con mutación <i>lacZ</i> producen colonias blancas en presencia de X-gal; el tipo salvaje produce colonias azules.
<i>lacZ</i> Δ M15	Delección específica N-terminal que permite un segmento de α -complementación presente en el vector pBluescript o Lambda ZAP II para hacer una proteína <i>lacZ</i> funcional.
proAB	Los mutantes requieren prolina para crecer en medio mínimo.
recA	Gen central para la recombinación general y reparación de DNA. La mutación elimina la recombinación general y produce bacterias sensibles a la luz UV.
recBCD	Exonucleasa V. La mutación en <i>recB</i> o <i>recC</i> reduce la recombinación general a un centésimo de su nivel normal y afecta la reparación de DNA
relA	Fenotipo <i>relaxed</i> ; permite la síntesis de RNA en ausencia de síntesis de proteína.
recJ	Exonucleasa involucrada en los caminos alternativos de recombinación de <i>E. coli</i> .

sbcBC	Exonucleasa I; permite la recombinación general en los huéspedes mutantes recBC.
supE	Supresor de mutaciones ámbar (UAG).
Thi-1	Mutantes que requieren vitamina B1 para crecer en medio mínimo.
traD36	La mutación inactiva la transferencia por conjugación del episoma F'.
umuC	Componente del camino de excisión UV.
uvrC	Componente del camino de reparación SOS.

1. INTRODUCCION

La familia Arenaviridae está formada hasta el presente por catorce virus aceptados por los comités internacionales de taxonomía y uno de reciente descubrimiento (R. Rico-Hesse, comunicación personal, 1991).

El nombre Arenavirus deriva del latín *arenosus* = arena y tiene su origen en el aspecto granuloso que presentan los viriones al microscopio electrónico, debido a la presencia de ribosomas en su interior.

El grupo fue creado en 1970 (Rowe *et al.*, 1970b; Pfau *et al.*, 1974) diferenciando a sus miembros de los arbovirus, donde originalmente habían sido incluidos.

De las catorce especies de arenavirus, cinco han sido aisladas de seres humanos: virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCM), Lassa, Junín, Machupo y, recientemente, Guanarito. De estas, las cuatro últimas son severamente patógenas para el hombre produciendo las denominadas "fiebres hemorrágicas". El virus Guanarito, recientemente descubierto, fue aislado de humanos durante una epidemia (en principio confundida con dengue) ocurrida en Venezuela. El virus LCM, aunque se lo ha asociado a meningitis aséptica, produce en el hombre infecciones inaparentes en la mayoría de los casos.

El virus LCM es el prototipo de la familia (Armstrong y Lillie, 1934) habiéndose aislado a partir de ratones y humanos (Lepine *et al.*, 1937; Rivers y Scott, 1937; Armstrong y Sweet, 1939).

Los síntomas de la enfermedad producida por el virus Junín, la fiebre hemorrágica argentina, fueron descriptos a partir de una epidemia ocurrida en los años 1953 y 1955 en Bragado, provincia de Buenos Aires (Aribalzaga, 1955).

En el caso de dicho virus, los aislamientos iniciales fueron obtenidos de roedores y ácaros (Parodi *et al.*, 1959a; Parodi *et al.*, 1959b) considerándose un arbovirus al creer que la fiebre hemorrágica era mediada por artrópodos (Mettler *et al.*, 1963). Sin embargo, no pudo probarse que los ácaros fueran vectores de la enfermedad, por lo que se supone que ha sido una detección casual en un artrópodo de hábitos hematófagos.

A partir de reacciones serológicas (recientemente Ruó *et al.*, 1991, con el uso de anticuerpos monoclonales) y considerando relaciones estructurales entre los distintos virus del grupo, se estableció una división entre Arenavirus del viejo mundo y Arenavirus del nuevo mundo (Dalton *et al.*, 1968; Murphy *et al.*, 1969; Murphy *et al.*, 1970; Rowe *et al.*, 1970a; Pfau, 1974; Pfau *et al.*, 1974; Murphy y Withfield, 1975; Rawls y Buchmeier, 1976; Buchmeier *et al.*, 1981). El criterio para esta agrupación

TABLA I.1: ARENAVIRIDAE

	DISTRIBUCION GEOGRAFICA	HOSPEDADOR	PATOGENICIDAD EN HUMANOS	GENOMA (Secuencia conocida)	REFERENCIAS
VIRUS DEL VIEJO MUNDO					
Ippy	República Centroafricana	<i>Praomys</i> sp. <i>Arvicantis</i> sp.			
Lassa	Africa Occidental Costa de Guinea	<i>Mastomys natalensis</i>	Fiebre de Lassa	RNA S cepas Josiah y Nigenian	1, 2, 3, 4
LCM	Cosmopolita	<i>Mus musculus</i>	Coriomeningitis linfocitaria aséptica	RNA S RNA L en cepa Arm	5, 6, 7 8, 9, 10
Mobala	República Centroafricana	<i>Praomys jacksoni</i>			11
Mopeia	Mozambique	<i>Mastomys natalensis</i>		RNA S	12, 13, 14
VIRUS DEL NUEVO MUNDO					
Ampari	Brasil	<i>Oryzomys</i> sp. <i>Neacomys guianae</i>			14, 15, 16
Flexal	Brasil	<i>Oryzomys</i> sp.			15, 17, 18
Guanarito	Venezuela	<i>Sigmodon hispidus</i> <i>Oryzomys</i> sp.?	Fiebre hemorrágica de Venezuela		Com. personal R. Rico-Hesse
Junín	Argentina (centro- norte Bs.As.; sur Santa Fe, Córdoba)	<i>Mus musculus</i> <i>Calomys musculus</i> <i>Akodon azarae</i>	Fiebre hemorrágica argentina	RNA S cepa MC2 RNA S parcial cepas Candid 1, XJ44	16, 17, 18 19, 20, 21
Latino	Bolivia	<i>Calomys callosus</i>			20, 22, 23
Machupo	Bolivia	<i>Calomys callosus</i>	Fiebre hemorrágica boliviana		21, 24, 25
Paraná	Paraguay oriental	<i>Oryzomys buccinatus</i>			22, 26
Pichinde	Colombia	<i>Oryzomys albigularis</i> <i>Thomazomys fuscatus</i>		RNA S	23, 24
Tacaribe	Trinidad	<i>Artibeus lituratus</i> <i>Artibeus jamaicensis</i>		RNA S RNA L	25, 26 27, 28, 29
Tamiami	Florida (EEUU)	<i>Sigmodon hispidus</i> <i>Oryzomys palustris</i>			30

fue confirmado a partir de los datos de la biología molecular (Buchmeier y Oldstone, 1978a; 1981; Compans *et al.*, 1981; Compans y Bishop, 1985).

En la Tabla I se resumen las características de las diferentes especies de arenavirus.

Es sumamente interesante el hecho de que los arenavirus (a excepción de LCM, que es cosmopolita) tienen una distribución geográfica muy definida (Howard, 1986). Del mismo modo es notable el hecho que todas las especies tienen como reservorio natural un roedor, excepto el virus Tacaribe cuyo reservorio es un quiróptero.

El área de dispersión está en relación con la distribución geográfica del hospedador y es probable que este sea un factor determinante del aislamiento geográfico de los distintos virus, y por ende, de su evolución (Arata y Gratz, 1975).

Cuando fue descubierto, el virus Junín estaba restringido a un área de 16.000 km² en la provincia de Buenos Aires, pero desde entonces su distribución se incrementó cinco veces hasta 1975 (Maiztegui y Sabatini, 1977) y alcanzó 120.000 km² en 1986 (Maiztegui *et al.*, 1986). Dado que en esa zona se encuentran tierras de gran valor agrícola-ganadero, el potencial peligro para los dos millones de habitantes de la región lo hacen un virus importante desde el punto de vista sanitario.

ESTRUCTURA DEL VIRION

Los arenavirus son virus envueltos por una bicapa lipídica que proviene de la célula hospedadora. Esta envoltura se produce en el momento de la brotación del virus, fenómeno que también arrastra el citoplasma adyacente a la membrana. La composición lipídica de los arenavirus ha sido estudiada en algunos de sus miembros, encontrándose que no tiene la misma composición cuantitativa y cualitativa que la membrana plasmática de las células infectadas por el virus (Rosas, 1984; Rosas *et al.*, 1988). Esta relación entre la brotación del virus y la membrana plasmática de la célula hospedadora ha dado lugar a diversos estudios acerca de la influencia de la infección viral en los procesos mediados por membranas tales como la variación de la permeabilidad a iones y la disminución de la actividad de las bombas de Na⁺/K⁺ y bomba de Ca⁺⁺ (Rey *et al.*, 1988; Rey, 1990)

Las partículas virales son pleomórficas, con un diámetro aproximado de 50 a 300 nm (Dalton *et al.*, 1968; Gschwender *et al.*, 1975; Murphy *et al.*, 1969; Murphy *et al.*, 1970; Murphy y Whitfield, 1975; Ofodile *et al.*,

Figura 1.1. Esquema de una partícula viral.

Se indican las dos formas de nucleocápsides S y L.

- Esquema de la estructura probable del RNA S de un arenavirus (N: gen de la proteína de la nucleocápside; GPC: gen del precursor de las glicoproteínas). Se indica el apareamiento de los extremos 3' y 5' (*pand-handle*) y la estructura probable de la región intergénica.
- Diagrama de las espículas de la superficie de un arenavirus de acuerdo al modelo de Burns et al. (1990) modificado. En él se indica la posible interacción de G2 con la nucleocápside a través de la proteína Z (M. Salvato, comunicación personal).

1973; Speir *et al.*, 1970). En el caso del virus Junín, los viriones son redondos u ovals con un diámetro promedio de 110-130 nm (Lascano y Berría, 1974).

En las microfotografías electrónicas el interior de los viriones aparece constituido por una materia amorfa constituida principalmente por citoplasma celular con gránulos electrondensos en cantidad variable, que son ribosomas. Su origen celular fue demostrado tanto por métodos genéticos como bioquímicos (Pedersen, 1970a, 1970b, 1970c; Carter *et al.*, 1973; Farber y Rawls, 1975; Añón *et al.*, 1976; Vezza *et al.*, 1977, 1978). El rRNA es metilado y su incorporación en los viriones puede inhibirse por actinomicina D (Carter *et al.*, 1973; Rawls *et al.*, 1973). Si bien se demostró su capacidad de traducción en sistemas *in vitro* (Chinault *et al.*, 1981; Giménez y Compans, 1980; Buchmeier *et al.*, 1981), la función de estos ribosomas en el virión es desconocida y, aunque en Pichindé se había descartado su participación en mecanismos de replicación viral (Howard y Simpson, 1980), la discusión se ha reabierto recientemente con el descubrimiento de mRNAs funcionales en el virion (Iapalucci *et al.*, 1989b; Salvato y Shimomaye, 1989).

El hecho que uno de los mRNAs de los virus Tacaribe y LCM se encuentre en la partícula viral podría llevar a pensar una asociación con los ribosomas en un sistema de traducción detenido, que se active en el momento de la infección por factores celulares, y que constituya un evento muy temprano del fenómeno de replicación-transcripción.

Características fisicoquímicas de las partículas virales

Densidad	Medio
1.17-1.18 g/ml	sacarosa (Añón 1976)
1.18-1.20 g/ml	CsCl (Coto 1972, Johnson 1973)
1.14 g/ml	amido triazole (Buchmeier <i>et al.</i> , 1981)

De datos obtenidos de experimentos de ultracentrifugación, se ha calculado un coeficiente de sedimentación de 500 S.

Para el virus Junín suficientemente purificado, la densidad de flotación en ClCs fue calculada en 1,20 g/ml (Romanowski, 1981).

PROTEINAS VIRALES

Tres proteínas mayoritarias se detectaron en las preparaciones de Arenavirus (Ramos *et al.*, 1972; Gard *et al.*, 1977; Martínez Segovia y De Mitri, 1977; Vezza *et al.*, 1977; Buchmeier *et al.*, 1977, 1978, 1981; Buchmeier y Oldstone, 1978a, 1978b, 1979, 1981; Gangemi *et al.*, 1978; Saleh *et al.*, 1979; Compans *et al.*, 1981; Grau *et al.*, 1981; Harnish *et al.*, 1981a, 1981b; Kiley *et al.*, 1981; Leung *et al.*, 1981; Boersma *et al.*, 1982; Dimmock *et al.*, 1982; Bruns *et al.*, 1983a, 1983b, 1986; Clegg y Lloyd, 1983; Parekh y Buchmeier, 1986; , Young *et al.*, 1981), a la cual se ha sumado una cuarta identificada en los virus Tacaribe y LCM, mediante anticuerpos generados contra el producto del gen clonado (Iapalucci *et al.*, 1989; Salvato y Shimomaye, 1989).

Estas proteínas se denominaron N (proteína de la nucleocápside viral), las glicoproteínas estructurales G1 y G2 (originadas a partir del precursor GPC), L (considerada la RNA polimerasa RNA dependiente o replicasa) y Z (una proteína recientemente caracterizada, con un potencial dominio de tipo "zinc finger").

GLICOPROTEINAS

Las glicoproteínas producidas por procesamiento del precursor se hallan en cantidades equimolares en el virión y son proteínas de superficie, observables al microscopio electrónico como espículas de 10 nm en la membrana que se pierden luego del tratamiento con proteasas (Lascano y Berría, 1974; Vezza *et al.*, 1977). Recientes estudios bioquímicos utilizando agentes químicos de entrecruzamiento han establecido un modelo estructural para las glicoproteínas del virus LCM que consiste en la formación de un tetrámero de G1 unido por puentes disulfuro como parte externa de las glicoproteínas y anclado en la membrana por G2 (Burns *et al.*, 1990). Este modelo se corresponde con las espículas antes mencionadas (Fig 1a).

Los mapas peptídicos obtenidos por digestiones enzimáticas de las glicoproteínas de los virus Pichindé y LCM son diferentes (Buchmeier y Oldstone, 1979; Harnish *et al.*, 1979; 1981; 1983).

Las dos glicoproteínas pueden ser removidas del virión por tratamientos con enzimas proteolíticas y detergentes no iónicos (Gard *et al.*, 1977, Vezza *et al.*, 1977; Buchmeier y Oldstone, 1978; Romanowski,

1981). Respecto a la cadena de polisacáridos es poco lo que se conoce (Boersma *et al.*, 1982, Wright *et al.*, 1990, Scolaro *et al.*, 1990), salvo que medidas de incorporación de azúcares marcados radiactivamente determinan un mayor grado de glicosilación de G1 (Ramos *et al.*, 1972; Vezza *et al.*, 1977; Buchmeier *et al.*, 1978).

Estudios de neutralización han mostrado que los anticuerpos monoclonales obtenidos contra G1 son más efectivos que aquéllos contra G2 (Buchmeier *et al.*, 1981;). Estos datos soportan la idea de que G1 es más externa. Para el virus Junín, Romanowski (1981) demostró el carácter extrínseco de G1 en viriones altamente purificados por iodinación *in vitro*. Recientemente, Scolaro *et al.*, 1990 realizaron experimentos de mapeo de péptidos que permitirían deducir que la glicoproteína del virus Junín presenta en sus cepas atenuadas modificaciones estructurales asociadas a la patogenicidad.

En Tacaribe y Tamiami, se ha detectado sólo una glicoproteína de peso molecular de 44 kDa. Por otra parte, el análisis de secuencia de aminoácidos del virus Tacaribe ha mostrado la falta del sitio propuesto para el clivaje por proteasas celulares (Franze-Fernández *et al.*, 1987), aunque se supone que existe procesamiento. El procesamiento proteolítico del precursor GPC de Tacaribe y Tamiami, seguramente, produce dos glicoproteínas G1 y G2 de pesos moleculares aparentes muy próximos que no se alcanzan a resolver como bandas distintas por electroforesis en gel de poliacrilamida. Alternativamente, es posible que una de las glicoproteínas, G1, se pierda parcialmente durante el proceso de purificación de las partículas virales (Burns y Buchmeier, comunicación personal).

El peso molecular de las diferentes GP ha sido calculado, ya sea, a partir de corridas electroforéticas o de la secuencia de aminoácidos obtenida por clonado molecular y ha resultado ser similar para los diferentes arenavirus.

No se ha detectado, hasta ahora, la presencia de grupos fosfato o sulfato en asociación covalente con estas GP.

El estudio de las secuencias aminoacídicas derivadas de secuencias de nucleótidos de distintos arenavirus ha demostrado diferentes grados de homología, regiones consenso y, en particular, la conservación de algunos de los sitios potenciales de N-glicosilación.

Análisis de biosíntesis de la GP muestran el proceso de clivaje: en LCM un precursor de alta manosa de 75 kDa es modificado en una etapa postraducciona por proteólisis enzimática en el Golgi medio y procesamiento de oligosacáridos en el trans-Golgi rindiendo 2 proteínas, G1

y G2 de 44 y 35 kDa, respectivamente, con 5 y 2 oligosacáridos complejos ligados por asparagina (Wright *et al.*, 1990).

Buchmeier *et al.* (1987) determinaron que el sitio de clivaje en el precursor de la glicoproteína de LCM se encuentra en la secuencia básica, Arg₂₆₂-Arg₂₆₃ o en las proximidades de la misma. Este sitio está seguido por una serie de 23 residuos hidrofóbicos. Esta secuencia característica se conserva en las dos cepas estudiadas de LCM (ARM y WE), Lassa (Auperin *et al.*, 1986), Pichindé, aunque la secuencia Arg-Arg es reemplazada por la secuencia Arg-Lys (Auperin *et al.*, 1983) y Junín (Ghiringhelli *et al.*, 1991).

La proteasa que procesa las GP se ha confirmado como intracelular, no codificada por el genoma viral.

El uso de anticuerpos monoclonales para el mapeo de epitopes y la microsecuenciación de las glicoproteínas de LCM han permitido establecer que G1 proviene de la región amino terminal del precursor de 75 kDa (Buchmeier *et al.*, 1987; Burns *et al.*, 1990). Esta es la responsable principal de la reactividad inmunológica propia de cada virus. Tal como se observa del análisis de secuencias aminoacídicas, es la región más variable de las GPC, lo que explicaría la especificidad inmunológica.

En cambio, formada a partir de la mitad carboxilo terminal, G2 es más conservada y muestra reactividad inmunológica cruzada. El análisis de la secuencia de la glicoproteína de Junín (Ghiringhelli *et al.*, 1991) muestra semejanzas con LCM en cuanto a la disposición de las señales de procesamiento y variabilidad de aminoácidos en G1 y G2.

Una mención aparte merecen los virus Tacaribe y Tamiami respecto a Junín. La homología entre la GP de Tacaribe y de Junín es del orden del 66%, pero si se analizan las zonas amino terminal (G1) y carboxilo terminal (G2), la homología es de 46 y 82% respectivamente, con la diferencia que Tacaribe (y quizás Tamiami) no presentan el consenso de clivaje Arg-Arg sino Arg-Thr, más los 23 residuos hidrofóbicos.

Estas proteínas deberían estar involucradas en la interacción virión-célula a través de un receptor aún no identificado.

La glicoproteína, como rasgo interesante, presenta epitopes conservados con la proteína de la nucleocápside entre los arenavirus africanos entre sí por un lado y los del Continente Americano, por otro (Buchmeier y Parekh, 1987).

NUCLEOCAPSIDE

Estudios de microscopía electrónica de viriones desarmados con detergentes no iónicos han mostrado que la fracción de 1,34-1,37 g/cm³ de CsCl corresponde a la nucleocápside, formada por RNA viral y proteína de la nucleocápside (N). Estas estructuras son circulares y con aspecto de collar de perlas (Palmer *et al.*, 1977). Estas nucleocápsides presentan, dentro de una población heterogénea, los tamaños mayoritarios de 640 nm y 1300 nm que corresponden a los diferentes tamaños del RNA viral.

Veza *et al.* (1977) describieron una estructura semejante para Pichindé y, posteriormente, un cuidadoso trabajo de Young y Howard (1983) determinó con mayor resolución la estructura de las nucleocápsides. Estos estudios de microscopía electrónica permitieron identificar partículas de 4-5 nm que forman estructuras helicoidales de 12 a 15 nm de diámetro. La proteína N fue detectada utilizando anticuerpos específicos e inmunoglobulinas contra dichos anticuerpos conjugadas con oro coloidal.

El aspecto circular de la nucleocápside de los arenavirus podría deberse al apareamiento de bases entre los extremos 3' y 5' del RNA viral (Auperin *et al.*, 1984; Romanowski *et al.*, 1985). Este fenómeno puede deducirse a partir de la complementariedad de las secuencias de todos los arenavirus analizados, aunque la existencia de esta estructura secundaria aún no se ha probado de manera experimental. En el caso de los RNAs genómicos del virus influenza (Hsu *et al.*, 1987) y el bunyavirus La Crosse (Raju y Kolakofsky, 1989), que contienen secuencias complementarias en los extremos 5' y 3', se efectuaron experimentos de entrecruzamiento químico, que permitieron comprobar la existencia de las estructuras de doble cadena propuestas.

En el virus Junín se determinó que las nucleocápsides purificadas a partir de viriones desensamblados y analizados por ultracentrifugación en gradientes de CsCl está asociada al polipéptido de 60-64 kDa descrito como mayoritario en los viriones o en células infectadas (Martínez Segovia y De Mitri, 1977; Grau *et al.*, 1981; Romanowski, 1981).

Esta proteína N, tanto como los productos derivados del clivaje proteolítico que a veces se observan en células infectadas, se ha encontrado como antígeno responsable de la fijación de complemento (De Mitri y Martínez Segovia, 1980).

Este ensayo fue usado en los primeros estudios de las relaciones entre distintos arenavirus (Rowe *et al.*, 1970; Casals *et al.*, 1975) que

determinaron la asociación de las especies en arenavirus del Nuevo Mundo (o complejo Tacaribe) y del Viejo Mundo.

La proteína N es la más abundante representando un 70% de la masa proteica viral. En Pichindé se ha estimado que hay unas 1500 moléculas de proteína N por virion y 400 entre G1 y G2 sumadas (Vezza *et al.*, 1977).

La comparación de secuencias aminoacídicas de diferentes N demuestra la conservación de la misma en un 50-63% de homología (Auperin *et al.*, 1984a; Auperin *et al.*, 1984b; Romanowski y Bishop, 1985; Romanowski *et al.*, 1985; Clegg y Oram, 1985; Franze Fernández *et al.*, 1987; Southern y Bishop, 1987).

Esta proteína N puede hallarse, al menos en LCM y Pichindé, como proteína fosforilada (NP). Esta fosforilación depende de una actividad de proteinquinasa asociada al virión que utiliza como sustrato a la proteína N (Howard y Buchmeier, 1983). Esta actividad no se asigna aún a proteínas del virión en particular, aunque como se verá en párrafos siguientes, podría pensarse que la proteína L de 200 kDa está implicada en la fosforilación.

Bruns *et al.* (1989) afirman haber detectado al menos un epítopo de N en la superficie del virión de LCM, así como en la superficie de células L infectadas. Esta observación ha sido soportada en teoría por el hecho de que N presenta regiones hidrofóbicas que podrían anclarla en la membrana celular.

La proteína N ha sido localizada en el citoplasma de las células infectadas ya sea por microscopía óptica o electrónica. Young *et al.* (1987) describieron la proteína N presente en el núcleo de las células infectadas con Pichindé, aspecto no demostrado en los demás arenavirus.

Por otra parte, se ha mostrado que la proteína N de los virus Junín, Pichindé y Lassa puede dar lugar a un procesamiento o degradación produciendo un polipéptido de 25 kDa (Harnish *et al.*, 1981; Young *et al.*, 1987; Sánchez *et al.*, 1989). Este producto puede liberarse por lavado de las células infectadas con el virus Junín y detectarse libre en el medio de cultivo sobrenadante, de donde puede suponerse asociado a la superficie celular (De Mitri, comunicación personal). Por el contrario, en células infectadas con Pichinde la localización del mismo sería intranuclear (Young *et al.*, 1987). Resultados tan contradictorios muestran que dista bastante de estar aclarada con certeza la cuestión de la procedencia y la función de dicho polipéptido en las células infectadas. Las técnicas de expresión de genes clonados desarrolladas y analizadas en esta tesis, podrían permitir en el futuro dilucidar estos aspectos de la biología de los arenavirus.

PROTEINA L

Esta proteína se halla asociada a la nucleocápside viral formando un complejo ribonucleoproteico.

La proteína L es un polipéptido no glicosilado (Harnish *et al.*, 1981; 1983) con un peso molecular aproximado de 200 kDa. La actividad que se le atribuye es la de RNA polimerasa RNA dependiente ("replicasa") análoga a la proteína L de rhabdovirus y paramixovirus. Mutantes del RNA L han mostrado capacidad de alterar la morfología de la placas de lisis y la virulencia y letalidad del virus LCM (Riviere *et al.*, 1985b). De esto se puede inferir una función en los mecanismos de replicación y establecimiento de infecciones persistentes (Singh *et al.*, 1987). Siendo la proteína L codificada por un gen de gran tamaño es un blanco fácil de mutaciones que alteren sus funciones (Schubert *et al.*, 1984) dando lugar a formas que, por ejemplo, generen productos de transcripción defectuosos relacionados con las infecciones persistentes (Francis y Southern, 1988). De todos modos, al respecto existen otras teorías diferentes (Bruns *et al.*, 1990).

Un análisis reciente de la secuencia de aminoácidos deducida a partir del gen clonado de los virus Tacaribe y LCM (Iapalucci *et al.*, 1989a; Salvato *et al.*, 1989) muestra regiones consenso con aquellas que corresponden a replicasas virales, si bien no hay una correspondencia total con la que indican Kamer y Argos (1984) para replicasas de virus y Tordo *et al.* (1988) y Galinski *et al.* (1988) para replicasas de virus a RNA de polaridad negativa. Este hecho hace suponer que sería un tipo particular de replicasas (Salvato *et al.*, 1989).

Un aspecto llamativo es que, si bien la proteína L presenta estas regiones consenso con otras replicasas, el análisis en bancos de datos revela homologías poco explicables. Así, la replicasa del virus de la estomatitis vesicular (VSV) presenta mayor homología con la proteína N del virus LCM (Salvato *et al.*, 1989) que con la replicasa misma, aunque esto debería considerarse como un caso de evolución convergente.

Por otra parte, presenta una región que podría estar asociada con una actividad de protein-quinasa, ya que la secuencia Asn-Leu-Lys-Leu-Gly-Asp la asemeja a la serin protein-quinasa cde²⁸ (Salvato *et al.*, 1989). Esto concuerda con lo postulado para el virus Pichindé por Howard y Buchmeier (1983)

De todos modos, esta proteína no ha sido totalmente purificada hasta hoy como para analizar su actividad de polimerasa en un sistema *in vitro*. En el virus LCM se han realizado estudios de la actividad de replicasa en

viriones (Fuller-Pace y Southern, 1988). Más recientemente, trabajos preliminares con el virus Pichindé permitirían establecer la actividad de polimerasa a partir de que, complejos ribonucleoproteicos purificados de células BHK21 infectadas son capaces de sintetizar RNA viral *in vitro* (Oubiña *et al.*, 1990).

Recientes estudios de los mecanismos de replicación del virus Tacaribe han llevado a atribuir una posible actividad de nucleasa (Raju *et al.*, 1990, Garcin y Kolakofsky, 1990) y quizás de enzima de "capping" (Garcin y Kolakofsky, 1990).

PROTEINA Z

Esta proteína, detectada en principio como una proteína no identificada de unos 14 kDa en el virus LCM (Buchmeier y Parekh, 1987), está codificada por el gen Z del RNA L. Casi todo lo que se conoce proviene de los estudios de clonado llevados a cabo por Iapalucci *et al.* (1989b) en el virus Tacaribe y por Salvato y Shimomaye (1989) en LCM. Estos trabajos permitieron identificar un marco de lectura abierto de polaridad viral para una proteína de 10 kDa con una secuencia de tipo "zinc finger" en la región carboxilo terminal. La proteína Z se homóloga a la proteína NS (no estructural) de paramixovirus y rhabdovirus y a la proteína Tat de HIV.

Las características del polipéptido la asemejan a proteínas de pegado a RNA con una posible acción regulatoria de la transcripción en etapas tempranas. Esto se refuerza con el hecho que el mRNA Z se halla encapsidado en los viriones, de tal modo que podría ser traducido en cuanto el virus entra a la célula sin necesidad de mediar la formación del RNA L viral complementario para su transcripción.

Homologando a la proteína Z con Tat, Salvato y Shimomaye (1989) le atribuyen una posible función de regulación de la transcripción como antiterminador o como proteína transregulatoria de genes celulares. Esto permitiría explicar los efectos de alteración de los patrones de transcripción de las células infectadas con el virus LCM (Klavinskis y Oldstone, 1988) o la inducción de la desdiferenciación celular (Oldstone *et al.*, 1977).

Otra posible función de la proteína Z podría ser la interacción entre el RNA viral y otras proteínas que contribuyan al ensamblado del virión como son G1 y G2 según se muestra en la figura 1c (Salvato, comunicación personal).

GENOMA Y ESTRATEGIA DE CODIFICACION

La información genética de los Arenavirus está contenida en un genoma de RNA de simple cadena bipartito. Ambos segmentos llamados S y L presentan tamaños diferentes; el menor (denominado S) tiene unos 3500 nucleótidos (22-25S) y el mayor (L) unos 7000-7500 nucleótidos (31-37S), determinando una capacidad génica codificante de unos 11000 nucleótidos. Tacaribe y LCM son hasta el momento los únicos representantes de la familia cuyo genoma ha sido totalmente secuenciado (Romanowski *et al.*, 1985; Romanowski y Bishop, 1985; Franze-Fernández *et al.*, 1986; Iapalucci *et al.*, 1989a, 1989b; Salvato *et al.*, 1989; Salvato y Shimomaye, 1989).

La proporción de las moléculas de cada uno de los RNA es variable en los viriones, aunque para ser infectivos debe haber, al menos, una de cada tipo, pero siempre con un mayor número de moléculas del RNA S. La dotación génica de los arenavirus se comporta como si fuese al menos diploide para el RNA S (Romanowski y Bishop, 1983).

En todas las preparaciones virales se han hallado otros RNAs que acompañan al genoma: 4-6S, 18S y 28S que corresponden a rRNAs originarios de los ribosomas del virión (Abelson *et al.*, 1969; Pedersen, 1970; Carter *et al.*, 1973a; Añón *et al.*, 1976; Vezza *et al.*, 1977; Ramsingh *et al.*, 1980; Dutko *et al.*, 1981).

En algunas preparaciones del virus Pichindé se ha detectado por Northern blot un RNA 15S, que algunos autores consideraron el mRNA de la proteína N (Farber y Rawls, 1975; Dutko *et al.*, 1976; Auperin *et al.*, 1984a; Bishop, 1990). Sin embargo, este resultado aún no ha sido comprobado experimentalmente.

Recientemente, se ha descrito la presencia de un mRNA de bajo peso molecular en preparaciones de viriones de los virus Tacaribe y LCM que corresponde al transcripto del gen Z. Es probable que este gen sea capaz de ser traducido por los ribosomas a los que se halla asociado en una etapa muy temprana de la replicación viral (Iapalucci *et al.*, 1989; Salvato y Shimomaye, 1989).

Las especies moleculares S y L codifican para distintas proteínas (Vezza *et al.*, 1978; Leung *et al.*, 1979; 1981; Harnish *et al.*, 1983) (Figura 1.2). El RNA S contiene el marco de lectura abierto para las proteínas N y GPC. El RNA L codifica para la replicasa y la proteína Z. En ambos casos los marcos de lectura abiertos de las proteínas codificadas son opuestos, lo que da una doble polaridad al RNA (de allí el nombre de

ambisense propuesto por Auperin *et al.*, 1984b). La doble polaridad es una estrategia de codificación que también presentan algunos géneros de los bunyavirus, una familia muy relacionada en este aspecto a los arenavirus (Elliot, 1990).

En esta estructura descrita, casi toda la capacidad codificante está aprovechada, presentando solamente regiones no codificantes en los extremos 3' y 5' y en la región intergénica entre N y GPC del RNA S y entre Z y L del RNA L (Figura 1.2).

En el extremo 3' del RNA S y L de los arenavirus que han sido secuenciados, se halla una secuencia de 19 nucleótidos común a todos ellos (Auperin *et al.*, 1982a; 1983b). Esta secuencia, 3'GCGTGTCACCTAGGATCCG5', se supone que podría tener alguna importancia en el reconocimiento de los RNAs por la RNA polimerasa en el inicio de la replicación. Esta característica es conocida también en los alfavirus (Ou *et al.*, 1981) y bunyavirus (Elliot, 1990). Los extremos 3' y 5' son complementarios y capaces de aparearse entre sí (más allá de la secuencia consenso) contribuyendo en la formación de la nucleocápside circular.

La región intergénica no codificante tiene como característica la capacidad de formar una estructura secundaria muy estable en forma de horquilla cuya posible función sería la de actuar como terminador de la transcripción (Romanowski *et al.*, 1985; Franze Fernández *et al.*, 1987; Ghiringhelli *et al.*, 1991; Iapalucci *et al.*, 1991; esta tesis). En la mayoría de los arenavirus, esta estructura es simple, pero durante la escritura de esta tesis, Wilson y Clegg (1991) describen una estructura doble en el RNA S del virus Mopeia, en tanto que Iapalucci *et al.* (1991) reinterpretan la versión corregida de la secuencia intergénica del virus Tacaribe considerándola una doble horquilla, tal como se la describió para el virus Junín (Ghiringhelli *et al.*, 1987).

Tanto la proteína L como N son traducidas de sus respectivos mRNAs transcriptos a partir del extremo 3' del RNA viral (correspondiente a la forma genómica, de polaridad negativa) y el GPC y Z a partir del 3' de la forma antígenómica (o viral complementaria -vc-) que es un intermediario obligado de la replicación. Hasta el presente no se ha podido probar que los genes codificados en la región 5' de los RNAs virales o viral-complementarios se traduzcan a partir de estas formas directamente, lo que hace suponer que el reconocimiento por los ribosomas incluye otros factores diferentes a las secuencias codificadas.

Una vez que el virus ha entrado a la célula comienzan una serie de

Figura 1.2. Esquema indicando la codificación del genoma de un arnavirus (formas virales).

La dirección de las flechas representa la dirección del marco de lectura abierto correspondiente a cada gen. La longitud de las mismas es proporcional al tamaño de cada gen.

N: gen de la proteína de la nucleocápside (polaridad negativa).

GPC: gen del precursor de la glicoproteína (polaridad positiva).

Z: gen que codifica una proteína con una región tipo zinc finger (polaridad negativa).

L: gen que codifica la presunta RNA polimerasa RNA dependiente (polaridad positiva).

eventos que incluyen por un lado la transcripción y traducción de las proteínas virales, el ensamblado de la nucleocápside y finalmente la brotación de la partícula viral y por otra parte una interacción del virus con la célula hospedadora ya sea estableciendo infecciones persistentes o líticas, dependiendo de la línea celular.

PARTICULAS DEFECTIVAS E INTERFERENCIA VIRAL

Los viriones generados durante la infección de células animales por cualquier virus no son todos infectivos. Una proporción variable de ellos son formas mutantes, incompletas en la mayoría de los casos, y con delecciones importantes en su genoma. Estas partículas se liberan al medio de la misma manera que los virus normales (Fenner et al., 1974). Para diferenciarlos de los virus infectivos, Huang y Baltimore (1970) propusieron el nombre de partículas defectivas interferentes (DI) y las definieron en base a cuatro caracteres: 1) pierden parte del genoma; 2) presentan las proteínas normales de los virus infectivos; 3) replican sólo en presencia de virus infectivos homólogos o muy relacionados, y 4) interfieren con la replicación de las partículas infectivas (Huang y Baltimore, 1977). Barret y Dimmock (1986) han publicado recientemente una revisión del tema en la que pueden encontrarse descripciones detalladas de este fenómeno.

En virus con genoma de RNA las delecciones son variables: en el virus Sindbis afectan la información necesaria para la replicación y el ensamblado (Levis et al., 1986), en el fago Q β se encontraron en el gen de la replicasa (Inokuchi e Hirashima, 1987) y en los coronavirus se encontraron dispersas en el genoma, pero afectando la replicasa (Makino et al., 1988).

La característica principal de las partículas DI es la de interferir con la replicación del virus del cual provienen sin inhibirla totalmente, de modo tal que puedan seguir produciéndose las formas DI a expensas de la maquinaria replicativa de los virus infectivos. Este fenómeno puede observarse también en los arenavirus: en titulaciones realizadas con multiplicidades de infección de más de 1 ufp por célula el efecto lítico del virus se atenúa al punto de tener monocapas de células con aspecto normal, al tiempo que las sucesivas diluciones de un mismo inóculo son capaces de formar placas de lisis, debido a que a multiplicidades de infección menores que 0,01 ufp por célula, la probabilidad de coinfección

de una partícula infectiva y una DI resulta despreciable (Popescu *et al.*, 1976; Dutko y Pfau, 1978; Welsh y Pfau, 1982). Este fenómeno, denominado autointerferencia, puede ocurrir entre diferentes arenavirus (Giménez y Compans, 1980) y puede observarse también como sobrevida de animales infectados con altas dosis de, por ejemplo, virus Junín (Help y Coto, 1980). Por otra parte, el efecto de interferencia anula el efecto citopático que se produce en las células luego de la infección viral (Dutko y Pfau, 1978; López y Franze-Fernández, 1985; López, 1986).

Las partículas DI de los arenavirus se generan en una alta proporción a partir de células persistentemente infectadas y fueron descriptas en detalle para los virus LCM (Welsh *et al.*, 1975; Popescu y Lehmann-Grube, 1977; Pedersen, 1979; Welsh y Buchmeier, 1979; Martínez Peralta *et al.*, 1983) Tacaribe, (Giménez y Compans, 1980) y Pichindé (Dutko *et al.*, 1976, Dutko y Pfau, 1978). Estas se caracterizan por tener viriones de menor tamaño que los infectivos, igual composición proteica, aunque con una disminución de la proporción de GPC y G1 + G2 y aumento de N y formas de RNA S y L de menor tamaño, que evidenciarían algún tipo de delección (Romanowski y Bishop, resultados no publicados). Bruns *et al.* (1990) han propuesto un modelo de replicación del RNA S del virus LCM en células BHK, que permitiría explicar la formación de las partículas DI (ver capítulo 6).

De todas maneras, estamos aún lejos de aclarar con certeza la generación de las partículas DI de los arenavirus y de comprender los mecanismos moleculares de la interferencia.

INFECCIONES PERSISTENTES

Una de las características más interesantes de los arenavirus es su capacidad de producir infecciones persistentes. En este sentido, el estudio de la persistencia del virus LCM, ya sea en cultivo de células o en animales, ha permitido comprender una gran cantidad de fenómenos de inmunobiología viral y de interacciones celulares (Oldstone *et al.*, 1978). Una de las cuestiones de mayor importancia es el esclarecimiento de la incapacidad del sistema inmune de un organismo para reconocer e interferir con la acción de los virus (Zinkernagel y Doherty, 1974; 1977; Welsh y Oldstone, 1977; Zinkernagel *et al.*, 1982; Whitton *et al.*, 1988a; 1988b). Estos aspectos son tan variados que serían suficientes para más que una introducción a la biología de los arenavirus.

La persistencia a nivel celular es demostrable *in vitro* a partir de células que sobreviven a infecciones líticas de arenavirus y que pueden subcultivarse indefinidamente. Estas células se caracterizan por tener una morfología y crecimiento igual a las no infectadas, por presentar una mayor expresión de la proteína N con una drástica disminución de la expresión de la GPC y ser resistentes a infecciones con virus homólogos -no así, con heterólogos. Como punto destacable, el establecimiento *in vitro* de una infección persistente, trae aparejada la producción cíclica de partículas DI e infectivas (Popescu y Lehmann Grube, 1977).

CITOPATOGENICIDAD

La infección viral se halla asociada a cambios en la morfología y fisiología celular. El conjunto de fenómenos asociados a la infección viral que determinan estos cambios se denomina efecto citopático.

En el virus Junín, al igual que los demás arenavirus la infección presenta dos etapas: la etapa inicial se caracteriza por una marcada citopatogenicidad, con destrucción celular y alta producción de viriones. Esta etapa se inicia a partir de focos de células infectadas con un marcado efecto citopático que altera su morfología, rodeadas de otras células de aspecto normal (López, 1986), extendiéndose luego al resto de la monocapa (Tkaczewski y Boxaca, 1970; Tkaczewski y Correa, 1972). Las células que sobreviven a esta etapa de la infección reconstituyen la monocapa con involución del efecto citopático visible al microscopio y establecen las infecciones persistentes.

El efecto citopático más marcado en las infecciones de arenavirus es el cambio de morfología celular. Este se da en ciertas líneas celulares susceptibles como HeLa, VERO, CV-1 y MDCK. En cambio células como la línea BHK-21 no presentan un efecto citopático marcado (sin embargo se han reportado cambios morfológicos en etapas agudas a alta multiplicidad de infección con el virus LCM (Romanowski, comunicación personal) o Tacaribe (Garcin y Kolakofsky, 1990). Este efecto se caracteriza por una extensa vacuolización del citoplasma, aparición de cuerpos de inclusión polimórficos basófilos irregularmente distribuidos en el citoplasma o cerca de la membrana nuclear (Tkaczewski y Correa, 1972). Estos cuerpos de inclusión, vistos al microscopio electrónico, son estructuras membranosas que incluyen partículas de aspecto ribosomal o ribonucleoproteicas (Murphy *et al.*, 1970) o solamente estructuras multilamelares como se observó en LCM (Mannweiler y

Lehman Grube, 1973). Frecuentemente aparecen células gigantes de nucleolo marcadamente distinguible (Tkaczewski y Boxaca, 1970). A nivel bioquímico se han descrito como efecto citopático disminución en el nivel de acetilcolinesterasa en células de neuroblastoma infectadas con el virus LCM (Oldstone *et al.*, 1977) o modificaciones en los niveles de transcripción de genes (como disminución de los niveles de expresión de la hormona de crecimiento), aunque sin alterar funciones de mantenimiento celular o *house-keeping* (Klavinskis y Oldstone, 1989).

VIRUS CON GENOMA DE RNA NEGATIVO

Varias familias de virus están relacionadas con los arenavirus por las características de su material genético. Todas ellas tienen el genoma compuesto de RNA de simple cadena y estrategia de codificación con polaridad negativa (excepto los géneros Uukuvirus y Flebovirus, dentro de los Bunyaviridae, que son ambisentido).

En la tabla 1.2 se resumen las características de cada una de ellas. Todas las menciones posteriores de las mismas en esta tesis se harán teniendo en cuenta dicha tabla.

TABLA 1.2: Virus con genoma de RNA de polaridad negativa

GRUPO	Proteínas del complejo RNP-nucleocapside			Glicoproteínas de la membrana					Otras prot.		Proteínas de función desconocida	Replicación Transcripción	mRNA	Ejemplo
	RNA polimerasa	Proteína no estructural	Proteína de nucleocápside	Neuraminidasa	Hemaglutinina	Fusión	Glicoproteína	Matriz						
RHABDOVIRIDAE	L (100)	NS (20)	N (40)	-	-	-	GP (45)	M (20)	-	-	por leader	poli A 5'cap metil.	VSV Rabia	
FILOVIRIDAE	L (180)	VP35? (32-35)	NP (100), VP30? (28)	-	-	-	GP (140)	VP24? (24)	VP40 (35-40)	-	por leader	?	Ebola Marburg	
PARAMYXOVIRIDAE	L (255)	P (67,5)	NP (57,8)	HN (64,3)	HN (64,3)	F (60)	-	M (39)	C (23), D (16)	-	por leader editing	poli A	Parainfluenza Sapión Sendai	
ORTOMYXOVIRUS	PB1 (96) PB2 (87) PA (85)	NS ₁ (26)	NP (50-60)	NA (48-63)	HA ₁ (36-40) HA ₂ (28)	-	-	M ₁ (27)	NS ₂ (14) M ₂ (15) M ₃	-	cap snatch	5'cap poli A	Influenza	
BUNYAVIRUS	L (250)	NS _S (10) NS _M (15)	NP (26-40)	-	-	-	G1 (120) G2 (30)	-	-	-	cap snatch	5'cap	La Crosse Snow shoe hare TSWV Hantaan	
ARENAVIRUS	L (200)	Z? (11)	N (60-64)	-	-	-	G1 (44) G2 (35)	Z? (11)	-	-	cap snatch	5'cap?	LCH Junín Tacaribe	

Entre paréntesis se indica su peso molecular en kDa (corresponde a la especie más representativa del grupo).

El signo de interrogación indica función propuesta, aún no probada o desconocida.

metil.: RNA metilado posttranscripcionalmente; 5'cap: estructura de capping; poli A: RNA poliadenilado.

2. MATERIALES Y METODOS

I. MATERIALES

I.1.1. PRODUCTOS QUIMICOS

En todos los casos se usaron reactivos de grado analítico de Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma (St.Louis, EE.UU.), Fluka (Buchs, Suiza), BDH (Poole, Inglaterra), Carlo Erba (Milan, Italia) o Mallinckrodt (Nueva York, EE.UU.).

Los reactivos y enzimas usados en los experimentos de manipulación de genes fueron de grado biología molecular de Sigma (St.Louis, EE.UU.), Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania), IBI (New Haven, EE.UU.), U.S.B. (Cleveland, EE.UU.), BRL (Gaithersburg, EE.UU.), Stratagene (La Jolla, EE.UU.), Promega (Madison, EE.UU.), New England Biolabs (Beverly, EE.UU.) o Perkin Elmer-Cetus (Norwalk, EE.UU.).

Todos los reactivos usados en los experimentos de expresión de genes fueron de grado de cultivo de células (libres de endotoxinas) de Sigma (St. Louis, EE.UU.); el DEAE-dextrano de Pharmacia (Uppsala, Suecia).

Los medios de cultivo bacteriano de Difco (Detroit, EE.UU.).

Los antibióticos gentamicina, ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol fueron gentilmente donados por Laboratorios Bagó.

Los medios de cultivo de células de Gibco (Grand Island, EE.UU.) o Flow (McLean, EE.UU.). El suero fetal bovino provino de Gibco (Grand Island, EE.UU.) o Bioser (Buenos Aires, Argentina).

I.1.2. MATERIAL RADIATIVO

El material usado fue de New England Nuclear (NEN) (Boston, EE.UU.) que proveyó [^{35}S]-metionina y [^{32}P]PO $_4\text{H}_3$. A partir de este último se sintetizaron los nucleótidos radiactivos γ [^{32}P]ATP, α [^{32}P]ATP y α [^{32}P]dATP utilizando la técnica de Walseth y Johnson (1979) con algunas modificaciones (ver apéndice I).

El dosaje del material radiactivo se realizó por medición con un contador Geiger (para [^{32}P]) o por medio de un contador de centelleo líquido ya sea con mezcla de centelleo ([^{35}S]) o por efecto Cerenkov ([^{32}P]), según las necesidades.

Para las autorradiografías se usó película X-Omat de Kodak (Rochester, EE.UU.) revelándose con revelador manual para placas

radiográficas.

I.2.1. LINEAS CELULARES

Se utilizaron las siguientes líneas celulares, cuyo origen en todos los casos fue American Type Culture Collection (Rockville, EE.UU.):

BHK-21 (C-13): fibroblastos de riñón de hamster lactante (Stoker y McPherson, 1961).

VERO E6: fibroblastos de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aegypticus* (Yasumura y Kawakita, 1963).

CV-1: fibroblastos de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aegypticus* (Jensen et al., 1964).

HeLa S3: células tumorales epiteliales provenientes de cáncer de cuello de útero (Puck et al., 1956).

Cos-1: células CV-1 transfectadas que expresan de forma estable el antígeno T del virus SV40 (Gluzman, 1981).

I.2.2. VIRUS

Se usaron inóculos de los virus LCM -(cepa WE) y Junín (cepa MC2). La cepa MC2 fue aislada originariamente de un roedor de la zona de Mones Cazón (Vilches et al., 1965; De Mitri y Martínez Segovia, 1971).

Los inóculos provenían del laboratorio de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas de la U.N.L.P. obtenidos por pasaje por cerebro de ratón lactante de un inóculo originalmente provisto por el Instituto Nacional de Microbiología "Carlos G. Malbrán".

Los inóculos fueron clonados por el método de placa aislada en tres pasajes sucesivos por células VERO.

Los inóculos del virus LCM-WE provienen de un clonado por tres pasajes de placa aislada en células VERO a partir de un clonado previo realizado en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Alabama en Birmingham. La historia del inóculo fue descripta por Romanowski y Bishop (1983) y vuelto a clonar en nuestro laboratorio para obtener inóculos de bajo número de partículas DI.

I.2.3. CEPAS BACTERIANAS

En los experimentos de clonado y manipulación de genes se usaron las siguientes cepas de *E. coli*:

TG1	(hsdΔ5, supE, thi ⁻ , Δ(lac-proAB), F'[proAB ⁺ , traD36, lacI ^q lacZΔM15]) (Gibson, 1984).
DH5αF'	(endA1, hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, ΔlacU169 (ϕ80 lacZΔM15)[F']) (Hanahan, 1983; BRL, 1986).
XL-1-Blue	(endA1, hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁺), supE44, thi-1, λ ⁻ , recA1, gyrA96, relA1, Δ(lac), [F', proAB, lacI ^q ZΔM15, Tn10(tet ^R)]) (Bullock et al., 1987).
SURE™	hdsR, mcrA, mcrB, mrr, endA1, supE44, thi-1, λ ⁻ , recA1, gyrA96, relA1, lac, recB, recJ, cbcC, umuC, uvrC, [F', proAB, lacI ^q ZΔM15, Tn10(tet ^R)] (Stratagene)

II. METODOS DE CULTIVO

II.1. CULTIVO DE CELULAS

Las distintas líneas celulares crecieron en monocapa usando material de plástico como sustrato (frascos o cajas de Petri). Los pasajes se efectuaron por tripsinización de la monocapa. El conteo de las células, cuando fue necesario, se realizó en una cámara de Neubauer y la viabilidad de determinó por exclusión de azul de tripano.

Los medios de cultivo usados fueron MEM (Minimal Essential Medium) de Gibco (Cat. 410-1500) para las células VERO y HeLa y DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium) de Gibco (Cat. 430-1600) para las células BHK-21, CV-1 y Cos-1. Ambos medios se suplementaron con glutamina hasta 2 mM final, gentamicina a 50 µg/ml y anfotericina a 1,5 µg/ml. El DMEM se suplementó con agregado de glucosa hasta 4,5 g/ml.

Para el crecimiento, los medios se suplementaron con 10% de suero fetal bovino. Para el mantenimiento de los cultivos se usó suero fetal bovino al 2% (Bioser, Buenos Aires).

Todas las líneas se cultivaron a 37°C en frascos de plástico cerrados. En cajas de Petri, la incubación se realizó en atmósfera de aire con 5% de CO₂ saturada con agua, agregando HEPES hasta 10 mM final a los

medios de cultivo.

El material de plástico usado en el cultivo de células fue provisto por Víctor, que me lo compró en lo de Leone Nunc (Roskilde, Dinamarca) o Corning Glass Work (Corning, EE.UU). Para su reutilización este material se lavó con solución diluída de Triton X-100, enjuagándose con abundante agua destilada, seguida de 5 enjuagues con agua bidestilada. Una vez seco, se lo esterilizó en un horno de microondas durante 3 ciclos de 5 min. en la máxima potencia.

II.2.1. PROPAGACION DE VIRUS

La producción de virus se llevó a cabo *in vitro* infectando células BHK21. Alternativamente, se usaron células VERO para la producción de RNA (de menor rendimiento de viriones).

Brevemente, las células en crecimiento exponencial (con la monocapa cubriendo el 50% de la superficie de cultivo) se lavaron con PBS y se inocularon con el stock de virus diluido en medio de Hanks de manera de lograr una multiplicidad de infección (mdi) de 0,1 unidad formadora de placas (ufp) por célula. Luego de un período de adsorción de 1 hr a 37°C las monocapas infectadas se lavaron con PBS y se incubaron a 37°C con medio de cultivo conteniendo 2% de suero fetal bovino.

A diferentes tiempos post infección se renovó el medio de cultivo, tomando alícuotas para titular y guardando el sobrenadante como inóculo a -135°C. Para la criopreservación se agregó suero bovino adulto y glicerol hasta 20% y 10% respectivamente.

Todos los procesos de manipulación de virus vivos o células infectadas se realizaron en condiciones de seguridad correspondientes a un laboratorio tipo P3 de acuerdo a las normas de bioseguridad para organismos patógenos establecidas por los Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU.

II.2.2. TITULACION DE VIRUS

Los títulos de los inóculos de virus se determinaron por el método de Dulbecco (1952) de ensayo de placas sobre monocapas de células VERO de acuerdo a Rustici (1984). El tiempo de adsorción fue de 60 min. para un volumen de inóculo de 100 µl por cada caja de Petri de 35 mm de diámetro.

Las condiciones óptimas para la determinación de los títulos fueron coincidentes con las recientemente publicadas por Bushar y Sagripanti (1990).

Las placas de lisis se detectaron por tinción de las monocapas de células con rojo neutro, lo que permitió recuperar clones de virus a partir de placas aisladas. Alternativamente, las monocapas se colorearon con cristal violeta al 0,5% en 50% metanol luego de fijar con formaldehído 3,7%.

II.2.3. PURIFICACION DE VIRIONES

Los viriones se purificaron parcialmente a partir del medio de cultivo sobrenadante de células infectadas.

Después del primer cambio de medio de cultivo, los sobrenadantes de los cultivos celulares infectados con el virus Junín ($\text{mdi} = 0,1 \text{ ufp/célula}$) se recogieron cada ocho horas durante el tercer, cuarto y quinto día post infección (Grau *et al.*, 1981; Rosas *et al.*, 1988). En el caso del virus LCM la recolección se hizo a las 24, 36, 48 y 60 horas post infección.

El medio fue centrifugado durante 15 min a $8.000 \times g$ y 4°C para eliminar restos celulares. El sobrenadante clarificado se sometió luego a una ultracentrifugación de 75 min a 54.000 rpm y 4°C en un rotor #70 Ti de Beckman Instrument Inc. (Nueva Jersey, EE.UU.). El sedimento resultante contenía las partículas virales, y se ^{usó} tanto como fuente de inóculo concentrado resuspendiéndolo en 1/100 del volumen original de medio de cultivo, como para extracción de RNA.

Existen métodos muy elaborados que garantizan una alta pureza de los viriones (Romanowski, 1981), pero para los experimentos llevados a cabo en esta tesis, el paso de ultracentrifugación a 54.000.rpm fue suficiente, con la ventaja de su rapidez y comodidad para el procesamiento de grandes cantidades de cultivo.

III. METODOS DE CLONADO Y SECUENCIACION.

III.1.1. EXTRACCION DE RNA DE VIRIONES

Cada sedimento de viriones obtenido por centrifugación se resuspendió en 200 μ l de solución TCG (isotiocianato de guanidinio 4 M - citrato de sodio 25 mM - sarkosyl 0,5% - β -mercaptoetanol 90 mM), con la ayuda de una varilla de vidrio estéril. Las preparaciones provenientes de diferentes sedimentos de una misma centrifugación se reunieron y se extrajeron con fenol ácido (1 vol.), cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 v/v (0,2 vol.) y 2 M acetato de sodio pH 4,3 (0,1 vol.), de acuerdo a la técnica de Chomczynski y Sacchi (1987) modificada. El RNA en la solución TCG obtenida luego de centrifugar la mezcla fenólica durante 10 min a 14.000 rpm en una microcentrífuga a 4°C, se purificó por un pasaje a través de un colchón de CsCl 5,7 M (Chirgwin et al., 1979). El pellet de RNA obtenido se resuspendió en agua tratada con DEPC y se guardó en alícuotas a -70°C. La calidad del RNA obtenido se analizó por electroforesis en geles de agarosa, como se describe en V.1.1.

III.1.2. EXTRACCION DE RNA DE CELULAS INFECTADAS

En preparaciones de gran cantidad de células se siguió el procedimiento descrito para la preparación de RNA de viriones, debido a que dio mejores rendimientos que otros métodos.

La monocapa de células se desprendió del sustrato usando PBS sin Ca^{++} ni Mg^{++} y con 5 mM final de EDTA en frío. La suspensión de células se centrifugó a baja velocidad en una centrífuga clínica, descartándose el sobrenadante. La lisis celular con solución TCG se efectuó usando un volumen equivalente a 20 veces el volumen del pellet de células obtenido en el paso anterior y homogeneización manual en un homogeneizador vidrio-teflon.

Cuando se trabajó con una gran cantidad de muestras de pequeño tamaño se siguió el procedimiento original de Chomczynski y Sacchi (1987).

El análisis del RNA celular se realizó de la misma manera que el de viriones.

III.2. SINTESIS DE cDNA

Se procedió de acuerdo al método de Gubler y Hoffman (1983) modificado (Gubler, 1988). Debido a la estructura secundaria compleja descripta para los RNAs de los arenavirus se usó hidróxido de metilmercurio 10 mM para desnaturalizar el RNA previamente a la hibridación de los oligonucleótidos de inicio de la síntesis (*primers*).

Los oligonucleótidos sintéticos se fosforilaron con polinucleótido quinasa del fago T4 y ATP antes de utilizarlos como *primers* en la síntesis de cDNA.

La secuencia de dichos oligonucleótidos es: 5'GCGTGTCACCTAGGATCCG3' (correspondiente a los nucleótidos 1-19 de la región 3' conservada en los arenavirus que describieron Auperin *et al.*, 1982a) y 5'CTACCTTTATACAACCTCT3' (correspondiente a los nucleótidos 848-866 de la secuencia obtenida con el primer clon de cDNA que correspondía al gen N).

III.2. CLONADO DE cDNA EN PLASMIDOS

El cDNA sintetizado con el *primer* 1-19 a partir de RNA viral se trató con DNA polimerasa del fago T4 de modo de formar extremos romos y se separaron diferentes tamaños por cromatografía de exclusión a través de Sepharosa CL-4B. La fracción que correspondía a cDNAs mayores de 500 bp se ligó con ligasa del fago T4 al vector pUC9 (Vieira y Messing, 1982) en el sitio HincII.

El cDNA obtenido con el *primer* 848-866 se metiló usando metilasa-*EcoRI* y S-adenosil metionina, de acuerdo a Maniatis *et al.* (1982), para ligar luego con ligasa del fago T4 a "linkers" que contenían el sitio de restricción *EcoRI*. El producto obtenido se digirió con *EcoRI*, se separó por tamaño tal como se describió en el párrafo anterior y se insertó en el sitio *EcoRI* del plásmido pUC13.

III.3.1. TRANSFORMACION DE BACTERIAS

En el clonado del RNA S se usaron las cepas *E.coli* TG1 o DH5 α F'. A partir de cultivos en líquido se prepararon bacterias competentes por el método de Hanahan (1983) usando los buffers TfbI y TfbII. Las bacterias así obtenidas se congelaron en el buffer TfbII a -135°C hasta su uso.

Para los experimentos de clonado se usaron aquellas preparaciones cuya eficiencia de transformación fue mayor de 10^6 bacterias transformadas por μg del plásmido pUC9 superenrollado. Las de eficiencia menor, se usaron en los experimentos de subclonado.

La transformación de las bacterias en los experimentos de clonado se efectuó por el mismo método que el descrito por Hanahan (1983) de acuerdo a las especificaciones de la cepa receptora (BRL, 1986; Bullock *et al.*, 1987).

En los experimentos de subclonado se usó en varias oportunidades el método de transformación rápida descrito por Golub (1988).

III.3.2. SELECCION DE RECOMBINANTES

Los plásmidos pUC9 y pUC13 tienen el gen de β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina y presentan una serie de sitios de clonado dentro del marco de lectura abierto del gen lac Z permitiendo alfa complementación para producir β -galactosidasa en cepas de *E.coli* que tienen una delección en dicho gen (ver apéndice 3). Las bacterias transformadas con las mezclas de ligación realizadas con pUC9 o pUC13 se sembraron sobre medio selectivo LB-agar con ampicilina ($50 \mu\text{g/ml}$) e indicadores de actividad de β -galactosidasa: el inductor IPTG ($20 \mu\text{l}$ de solución 100 mM por caja de 100 mm de diámetro) y el sustrato X-Gal ($50 \mu\text{l}$ de solución 2% en dimetilformamida por caja de 100 mm de diámetro) que es convertido en un compuesto coloreado por acción de dicha enzima. De esta manera, aquellas bacterias que recibieron un plásmido con una secuencia de cDNA insertada en el sitio de clonado, no expresan el gen lac Z y las colonias desarrolladas en el agar son blancas.

Las colonias así diferenciadas se repicaron por duplicado a medio LB-agar con ampicilina. Una de las réplicas obtenidas se usó para detectar clones recombinantes que contuvieran secuencias derivadas del RNA S o L del virus Junín por el método de hibridación de colonias (Grunstein y Hogness, 1975) modificado.

Las colonias desarrolladas en el agar se transfirieron por contacto a papel de filtro Whatman 541. Las colonias adheridas al papel se trataron por imbibición sucesiva en $0,5 \text{ M NaOH}$ durante 5 min. y dos veces de 5 min. cada una en TRIS-HCl 1 M pH $7,5$, luego en 2X SSC y, finalmente, en etanol. El filtro, una vez seco, se prehibridó durante 2 hs a 45°C durante en $6\text{X SSC} - 5\text{X Denhardt} - 1\% \text{ SDS} - 500 \mu\text{g/ml tRNA de levadura}$ y se

hibridó en las mismas condiciones durante 12 a 16 hs con el agregado de una sonda radiactiva. Luego de la hibridación los filtros se sometieron a lavados sucesivos de una hora con 6X SSC - 1% SDS a temperatura ambiente, 2X SSC - 1% SDS a 45°C y 1,5X SSC 0,025% SDS a 45°C, después de lo cual se expusieron para obtener una autorradiografía de los mismos.

Aquellas colonias que daban una señal positiva de hibridización se amplificaron en cultivo en líquido a partir del duplicado crecido en LB-agar, se purificaron sus plásmidos y se usaron para preparar sondas radiactivas con el fin de determinar por *Northern blot* (según V.1.2) la clase de RNA del cual provenían.

Una vez asignado el origen de los plásmidos recombinantes se procedió a la construcción de un mapa de sitios de restricción de los insertos.

III.3.3. SUBCLONADO DE RECOMBINANTES

Los insertos caracterizados por mapeo de restricción se subclonaron en el plásmido pBS SK+ (Bluescript™ de Stratagene, La Jolla, EE.UU.) ya sea para la reconstrucción de los genes N de LCM y Junín o para transcripción *in vitro* y en el plásmido pGEM3 (Promega Biotec) para transcripción *in vitro* de fragmentos del gen N o regiones no codificantes (ver apéndice 3). La selección de recombinantes se hizo de acuerdo al método anteriormente descrito o por selección al azar de colonias de pequeño tamaño de acuerdo a Karlovsky y Prell (1987).

Para proceder con la secuenciación, los insertos (reducidos por digestión con endonucleasas de restricción a fragmentos de no más de 400 pb) se subclonaron en la forma replicativa del fago M13 mp18 o mp19 (Yanish-Perron *et al.*, 1985), transformando luego *E.coli* TG1 o DH5 α F' y seleccionando los recombinantes por el mismo método de expresión de β -galactosidasa descrito para los vectores pUC, a excepción de que las placas de crecimiento retardado producidas por los fagos se resuspendieron en medio M9 y esa suspensión se usó directamente para amplificar el fago recombinante en cultivos en líquido de acuerdo a Vieira y Messing (1987).

III.4. PREPARACION DE PLASMIDOS

III.4.1. MINIPREPARACIONES

Para preparaciones de plásmido a pequeña escala se partió de 1 ml de cultivo bacteriano saturado en LB o TB, realizándose la extracción por el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly (1979). En caso de purificar recombinantes provenientes de clonados en el plásmido pBR322, que tiene un número de copias menor que los pUC, pBS o pGEM se partió de 5-10 ml de cultivo saturado.

III.4.2. MAXIPREPARACIONES

Cuando debieron prepararse grandes cantidades de plásmido con el fin de purificar fragmentos de DNA de pequeño tamaño se partió de cultivos líquidos de, al menos, 100 ml. La extracción se realizó por el mismo procedimiento que el usado en las minipreparaciones. El plásmido resultante, contaminado con oligonucleótidos de RNA o restos de DNA de alto peso molecular se purificó por ultrafiltración en geles de Sephacryl S-1000 (Pharmacia, Uppsala, Suecia).

III.4.3. MAXIPREPARACIONES PARA TRANSFECCIONES CELULARES

Para experimentos de transfección es imprescindible una muy alta pureza del plásmido a usar, ya que las formas relajadas del mismo reducen la eficiencia de entrada de DNA y la contaminación con proteínas bacterianas es tóxica para las células.

Para preparar plásmidos con este fin se siguió el protocolo de lisis alcalina y ultracentrifugación en gradientes de CsCl descrito por Gorman (1986) con modificaciones.

A cultivos en gran volumen (al menos 500 ml) y en fase logarítmica ($DO_{600}=0,5$) de los clones de *E.coli* que llevan el plásmido a purificar, se les agregó cloranfenicol (concentración final 70 $\mu\text{g/ml}$) con el fin de detener la replicación del DNA cromosomal sin interferir con la replicación del plásmido. Al cabo de 24 horas de crecimiento a 37°C con agitación (200 rpm en un agitador orbital) el cultivo se centrifugó 10 min a 3000xg. El pellet de bacterias obtenido se resuspendió en 1/100 del

volumen de cultivo de TRIS-HCl 50 mM pH 8 - glucosa 50 mM - EDTA 5 mM, incubando durante 5 min. Luego se agregaron 2 vol. (respecto al buffer de resuspensión) de NaOH 0,2 M - SDS 1% para producir la lisis celular. Al cabo de 5 min de incubación se agregaron 1,5 vol. (respecto al buffer de resuspensión) de solución de acetato de potasio 3 M pH 5,3 y se extendió la incubación otros 10 min, al cabo de lo cual se centrifugó la mezcla de lisis durante 15 min a 10.000xg. Se recogió el sobrenadante y se incorporaron 2,5 vol. (respecto del sobrenadante) de etanol, incubándose a -70°C durante 30 min. Luego se centrifugó durante 30 min a 10.000g y el pellet obtenido, después de secado por vacío, se resuspendió en 5 ml de TE (TRIS-HCl 10 mM pH 8 - EDTA 1 mM). Esta solución incluye DNA plasmídico superenrollado, DNA relajado y linearizado, RNA y proteínas. Para separarlos, se disolvió 1 g de CsCl por cada ml de solución obtenida, se agregaron 0,250 ml de una solución de bromuro de etidio 10 mg/ml y se ultracentrifugó durante 48 hs a 40.000 rpm y 18°C en un rotor #50 de Beckman. Al cabo de ese tiempo se observaron dos bandas separadas (DNA linear la superior y superenrollado la inferior) y un pellet (RNA). La fracción correspondiente al plásmido superenrollado se aisló por punción del tubo. Esta fracción se mezcló con 5 ml de una solución de 1 g de CsCl/ml de TE y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones descritas. La fracción de plásmido superenrollado se aisló por el mismo procedimiento anterior y el bromuro de etidio se eliminó por sucesivas extracciones con alcohol isoamílico saturado con NaCl 5 M. Luego se eliminó el CsCl por diálisis contra 2000 veces el volumen de la muestra de TE, con varios cambios del buffer. Finalmente, la muestra se llevó a 0,3 M de acetato de sodio y se precipitó por agregado de 2,5 volúmenes de etanol y posterior incubación durante una noche a -20°C. Luego de centrifugar 30 min a 15.000xg y 4°C, el pellet se resuspendió en agua a una concentración de 1 mg/ml de DNA (medido como absorbancia a 280 nm) y se guardó en alícuotas de 25 µl a -70°C.

La pureza del DNA obtenido se controló por electroforesis en geles de agarosa, sin detectarse otra forma que no fuese plásmido superenrollado. Para este rendimiento es importante trabajar en oscuridad en todas las etapas en que el DNA se halla en presencia de bromuro de etidio para evitar fotólisis.

Alternativamente, se usó el método de ultracentrifugación en gradientes preformados descripto por Babykin y Zinchenko (1985).

III.4.4. PREPARACION DE DNA DE SIMPLE CADENA DEL FAGO M13

Se realizó de acuerdo a la técnica de Messing (1987) por precipitación con PEG-acetato de sodio y posterior extracción fenólica de los fagos presentes en el sobrenadante de un cultivo bacteriano infectado.

III.5. SECUENCIACION DE DNA

III.5.1. METODO QUIMICO

Algunos fragmentos de DNA se secuenciaron de acuerdo al protocolo de Maxam y Gilbert (1980)

III.5.2. METODO DE TERMINACION DE CADENAS

III.5.2.1. SOBRE DNA DE SIMPLE CADENA

La mayor parte de los insertos de DNA se secuenció de acuerdo a la técnica de Sanger *et al.* (1977) usando como *primer* el oligonucleótido universal para secuenciación con el DNA del fago M13 y la forma modificada de la DNA polimerasa del fago T7 (Sequenase™, USB, Cleveland, EE.UU.). En las zonas cuya secuencia era difícil de determinar debido a la posible existencia de estructuras secundarias se usó dITP de acuerdo a lo recomendado por los fabricantes de Sequenase.

III.5.2.2. SOBRE DNA DE DOBLE CADENA

Para confirmar la identidad de secuencias subclonadas en plásmidos se utilizó el mismo método que se describió para el DNA de simple cadena pero usando como templado, plásmido purificado de acuerdo a Zagursky *et al.* (1985) y desnaturalizado con álcali.

En todos los casos los fragmentos de DNA se resolvieron en geles de poliacrilamida conteniendo urea 8 M como agente desnaturalizante (Sanger y Coulson, 1978).

III.5.3. ANALISIS DE LAS SECUENCIAS

Las secuencias fueron procesadas en una computadora personal IBM PS2 usando el programa DNASIS (Hitachi Software Engineering Co.) y Clustal (Higgins y Sharp, 1988; 1989).

Los datos de predicción de estructuras secundarias de proteínas y de búsqueda en bancos de datos fueron obtenidos con una computadora VAX usando el programa de Genetic Computer Group (GCG, Madison, Wisconsin, EE.UU.) operado por P.D. Ghiringhelli durante su estadía en el laboratorio del Dr. W.M. Degraive (Instituto Osvaldo Cruz de Río de Janeiro, Brasil).

III.6. PREPARACION DE SONDAS RADIATIVAS DE DNA

En los experimentos de hibridación de colonias o *Northern blot* se marcaron los fragmentos de restricción de DNA a utilizar como sonda con α [³²P]dATP por la técnica de *nick translation* (Rigby et al., 1975) o por extensión múltiple de oligonucleótidos al azar (Feinberg y Vogelstein, 1983).

La purificación de los fragmentos de restricción se realizó, luego de resolver las digestiones de los DNAs de interés por electroforesis en geles de agarosa, ya sea por electroelución (Maniatis et al., 1982) o por extracción con polvo de vidrio (Vogelstein y Gillespie, 1979).

En los experimentos iniciales de hibridación de colonias se utilizó como sonda el oligonucleótido 1-19 fosforilado con polinucleótido quinasa del fago T4 y γ [³²P]dATP (Ausubel et al., 1989) o bien *short copy DNA* generado como DNA de simple cadena por extensión del oligonucleótido 1-19 sobre RNA viral usando α [³²P]dATP (Bishop et al., 1982).

IV. METODOS DE ESTUDIO DE EXPRESION DE GENES CLONADOS

IV.1. TRANSFECCIONES CELULARES TRANSIENTES

IV.1.1. METODO DE DEAE-DEXTRANO

Consiste en el método originalmente descrito por Luthman y Magnusson (1983) y Lopata et al. (1984). Tal como se indica en el capítulo 4 se

utilizó principalmente con las líneas VERO y CV-1.

Las células, en crecimiento exponencial, se repicaron a razón de 2×10^5 células por caja de Petri de 60 mm de diámetro el día anterior a la transfección incubándose con medio de cultivo apropiado y 10% de suero fetal bovino a 37°C y 5% de CO₂. En el segundo día la monocapa se lavó cuidadosamente con 3 cambios de medio completo sin suero y se incubó luego a 37°C y 5% de CO₂ por 30 min. con 0,5 ml de medio completo sin suero conteniendo 500 µg/ml de DEAE-dextrano y 5 µg de plásmido. Al cabo de este tiempo las células devienen redondeadas y se desprenden fácilmente del sustrato, por lo que deben ser lavadas con mucho cuidado con tres cambios de TBS (TRIS-HCl 25 mM, NaCl 137 mM, KCl 3,2 mM, CaCl₂ 9,1 mM, MgCl₂ 4,9 mM pH 7,4) y luego incubadas en las mismas condiciones que antes por 3 hs en medio de crecimiento con cloroquina 0,1 mM. Finalmente las monocapas se lavan con dos cambios de medio y se incuban por 48-72 hs en las condiciones habituales de crecimiento hasta el análisis de la expresión.

IV.1.2. METODO DE PRECIPITACION CON FOSFATO DE CALCIO

El método que se utilizó fue una modificación del descrito por Chen y Okayama (1987). En ningún caso se usó *shock* de glicerol.

Células en crecimiento exponencial se repicaron a la misma densidad que la indicada para DEAE-dextrano. Después de 12 hs de incubación en medio de crecimiento a 37°C y 5% de CO₂ el medio de cultivo se reemplazó por 4 ml de medio fresco, incubándose otras 4 hs a 37°C y 3% de CO₂. Al cabo de ese tiempo se preparó el precipitado de DNA-fosfato de calcio de la siguiente manera: se mezclaron 8 µg de plásmido con 180 µl de agua y 20 µl de CaCl₂ 2,5 M y se adicionó a 200 µl de 2X BBS (50 mM BES pH 6,95, 280 mM NaCl, 1,50 mM KH₂PO₄, pH 7,20) incubando luego durante 30 min. a temperatura ambiente hasta observar la formación de un precipitado muy fino y disperso. Este se agregó al medio de cultivo de las células continuando la incubación en las condiciones de CO₂ reducido por 12-16 hs. Al cabo de este tiempo puede observarse al microscopio que las células se hallan cubiertas por el precipitado. En ese momento la monocapa se lavó muy cuidadosamente con dos cambios de PBS y se incubó por 48-72 hs a 37°C y 5% CO₂ en medio de crecimiento hasta el análisis de expresión.

IV.1.3. LIPOFECCION

Se utilizó el reactivo LipofectinTM de BRL (Gaithersburg, EE.UU.). Este reactivo es una mezcla de dioleil fosfatidiletanolamina (DOPE) y el lípido catiónico cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) (1:1 p/p) en agua (Dzgnez et al., 1989). Los lípidos pueden formar complejos con el DNA espontáneamente y posteriormente fusionarse a las membranas celulares con una alta eficiencia de entrada de plásmido a las células (Felgner et al., 1987).

El procedimiento de transfección fue el recomendado por los fabricantes, con modificaciones. Las células a transfectar se plaquearon a la misma densidad que para transfecciones con DEAE-dextrano en cajas de Petri de 35 o 60 mm de diámetro. En el momento de la transfección las monocapas se lavaron cuidadosamente con TBS tres veces y luego dos veces con medio de cultivo sin suero. La preparación de los liposomas se realizó mezclando una relación de 5 µg de DNA en 50 µl de agua con 30 µg de lipofectin en el mismo volumen, dejando reposar durante 15 min. a temperatura ambiente.

A las células lavadas se les agregó medio sin suero (1,25 ml para cajas de 35 mm y 3 ml para cajas de 60 mm) y 35 o 100 µl de complejo lípido-DNA de acuerdo al volumen de medio. Las células se incubaron por 16 hs a 37°C y 5% de CO₂, al cabo de lo cual se adicionó directamente a las cajas, un volumen de medio con 20% de suero fetal bovino equivalente al medio de cultivo inicial, de manera de llegar a un 10% final. En el caso de las transfecciones transientes, las células se incubaron en las mismas condiciones por 48-72 hs hasta el análisis de la expresión.

IV.2. TRANSFECCIONES CELULARES ESTABLES

Se realizó en base a la técnica diseñada por Southern y Berg (1984). Se procedió a transfectar las células de acuerdo al protocolo de fosfato de calcio o de lipofección. Luego del lavado del precipitado o del agregado de medio de crecimiento (en el caso de la lipofección) las células se incubaron 24 horas en las condiciones de crecimiento habituales. Al cabo de ese tiempo, la monocapa se repicó a gran dilución (habitualmente, las células contenidas en una caja de Petri de 35 mm de diámetro (10 cm³) se repicaban a dos cajas de 140 mm (175 cm³) dando una relación de aumento de superficie de 1 a 35).

Este repique se incubó por 24 hs en medio de crecimiento. Luego dicho medio se reemplazó por medio de crecimiento conteniendo 400 $\mu\text{g/ml}$ del antibiótico G-418 (medio selectivo). La incubación se prolongó por 4 a 6 semanas con reemplazo del medio selectivo cada 3 - 4 días. Al fin de este proceso, aquellas células que incorporaron de manera estable el vector de expresión y que expresan el gen de neomicina fosfotransferasa que este lleva, adquieren resistencia al G-418, generando cada una de ellas una colonia de células resistentes. En ese momento, cada uno de los clones (visibles a simple vista) se repicaron separadamente a policubetas de fosas de 10 mm de diámetro, posteriormente a policubetas de 35 mm y finalmente a frascos de cultivo de 25 cm^2 . Una parte de cada clon repicado se destinó para análisis por inmunofluorescencia de la expresión de los genes clonados. Los clones positivos para dicha expresión se amplificaron y congelaron, hasta su uso, por los procedimientos habituales.

IV.3.1. DETERMINACION DE LA FUNCIONALIDAD DE LOS VECTORES DE EXPRESION

Para determinar si los vectores de expresión empleados en los experimentos de expresión eran funcionales, se clonó en ellos el gen de β -galactosidasa, se transfectaron células de la manera indicada y se analizó la expresión de la enzima por el ensayo citoquímico de Kyu y Chae (1989). Estos controles permitieron establecer que los niveles de expresión de los vectores eran adecuados.

IV.3.2. DETERMINACION DE LA EFICIENCIA DE TRANSFECCION

La eficiencia de transfección en cada experimento se determinó como el porcentaje de células con inmunofluorescencia positiva usando anticuerpos contra la proteína codificada en el gen clonado respecto al número total de células vistas en varios campos del microscopio elegidos al azar. En el apéndice 4 se indican las condiciones óptimas para distintas cantidades de células.

Figura 2.1. Esquema del procedimiento de transfección y análisis de la expresión de genes clonados.

La explicación de cada paso se encuentra en el texto.

IV.4. ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE EXPRESION

IV.4.1. DETECCION DE PROTEINAS VIRALES POR INMUNOFLOURESCENCIA

Para el análisis de inmunofluoreescencia, las células se transfectaron o infectaron (en el caso de los controles positivos) luego de sembrarlas directamente sobre cubreobjetos de 24x24 mm. Al cabo del período de incubación correspondiente, las células se fijaron en 3,7% de formaldehído en PBS durante 30 min. a 37°C y se guardaron a 4°C hasta su uso. Este procedimiento permite mantener en óptimas condiciones las estructuras celulares para análisis morfológicos.

Con el fin de detectar las proteínas intracelulares, las células ya fijadas se permeabilizaron por tratamiento con 0,1% de Triton X-100 por 2 min. a temperatura ambiente o con acetona a -20°C por 1 min. (con este último tratamiento la muestra se puede almacenar indefinidamente a 4°C).

Luego se lavó la monocapa fijada con PBS y se preincubó 1 hr a 37°C con albúmina sérica bovina al 3% en NT (TRIS-HCl 25 mM pH 7,4, NaCl 50 mM), incubado después durante 1 hr con la dilución correspondiente del primer anticuerpo en 3% BSA en NT (para los anticuerpos monoclonales anti Junín o anti LCM usados, la dilución de trabajo fue 1/100 y para los policlonales humanos anti LCM, 1/25). Después de tres lavados sucesivos de 5 min cada uno con agitación permanente en NT, se incubó entre 30 y 60 min. a temperatura ambiente (con la dilución recomendada por los fabricantes) con el anticuerpo anti inmunoglobulina conjugado con isotiocianato de fluoresceína.

Finalmente los cubreobjetos se lavaron varias veces con NT y se realizó un último lavado con agua, montándose en n-propil gallato en glicerol o en Citifluor™ (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra) para prevenir la pérdida de fluorescencia por exposición al UV ("photo-bleaching").

Las muestras se observaron por epifluorescencia y contraste de fases en un fotomicroscopio Carl Zeiss equipado con los filtros recomendados por los fabricantes. Las microfotografías se tomaron empleando película de alta sensibilidad Kodak T MAX 400 (400 ASA) con revelado forzado a 1200 ASA o Kodak T MAX 3200 (3200 ASA).

Los monoclonales anti Junín fueron gentilmente cedidos por los Dr. D. Pifat y A. Sánchez (USAMRIID, Fort Dietrick, EE.UU.), los sueros policlonales de ratón anti Junín por la Dra. M.I. De Mitri, los monoclonales anti LCM por el Dr. D.H.L. Bishop (NERC Institute of Virology, Oxford,

Inglaterra) y los sueros policlonales humanos anti LCM fueron provistos por CDC (Atlanta, EEUU).

Los anticuerpos anti IgG de ratón o humano desarrollados en cabra y conjugados con FITC, se adquirieron a Sigma (St.Louis, EE.UU.), Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra) o Dakko (Copenhague, Dinamarca).

IV.4.2. CARACTERIZACION DE PROTEINAS VIRALES

Dos métodos se usaron para el análisis de la expresión de proteínas.

IV.4.2.1. WESTERN BLOT

Se siguió la técnica original de Burnette (1981). Las proteínas se prepararon por lisis directa de las células en el buffer de muestra (TRIS-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2%, β -mercaptoetanol 100 mM, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%), separándose en geles de poliacrilamida discontinuos (Laemmli, 1970). La electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa Schleicher & Schuell (New Hampshire, EE.UU.) se realizó durante 12-20 hs a 4°C y a 250 mA. El revelado de las proteínas virales se realizó de la siguiente manera: la membrana se bloqueó durante 3 hs a 37°C con una solución de leche descremada al 5% en NT para disminuir la señal inespecífica y posteriormente se incubó durante 1 hr a 37°C con anticuerpos específicos diluidos en la solución de bloqueo. Seguidamente se lavó varias veces con NT y se incubó con proteína A conjugada con oro coloidal de Auoprobe (La Habana, Cuba) por 3 hs a temperatura ambiente hasta obtener una señal diferenciable del fondo (Goding, 1978).

IV.4.2.2. INMUNOPRECIPITACION

A 48 hs postransfección, las células BHK-21 crecidas en cajas de Petri de 60 mm de diámetro se preincubaron por 30 min en DMEM sin metionina con 10% de suero fetal bovino dializado. Posteriormente se continuó incubando por 4 hs con el mismo medio suplementado con L-[³⁵S]-metionina (1066 Ci/mmol) hasta 20 μ Ci/ml final.

Las células se resuspendieron en PBS-EDTA 5 mM a 4°C se precipita-

ron por centrifugación a baja velocidad y se lisaron en 100 μ l de buffer conteniendo TRIS-HCl 25 mM pH 8, NaCl 50 mM, Triton X-100 1% y desoxicolato de sodio 1% durante 10 min en hielo. Los núcleos se separaron por centrifugación a 10000 rpm 10 min en una microcentrífuga y al sobrenadante se agregó SDS hasta 0,1% final para completar la disociación de las estructuras celulares.

50 μ l del lisado se incubó durante 1 hr a 37°C con 1 μ l de una mezcla de los anticuerpos monoclonales SA02-BG12, QB06-AW05 y NA05-AG12 específicos para nucleoproteína del virus Junín (Sánchez et al., 1989). Al cabo de la incubación se agregaron 10 μ l de suspensión de proteína G de *Streptococcus sp.* (Group C) de Sigma (St. Louis, EE.UU.) incubándose por otra hora a temperatura ambiente con agitación permanente (Goding, 1978). El inmunoprecipitado se separó por centrifugación, lavándose el pellet dos veces con buffer de lisis completo conteniendo 500 mM LiCl. El pellet lavado se resuspendió en buffer de muestra con SDS y β -mercaptoetanol y se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% de acuerdo a Laemmli (1970). Las proteínas se detectaron por fluorografía (Bonner y Laskey, 1974).

IV.5. ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE TRANSCRIPCION.

Se realizó por la técnica de *Northern blot*, tal como se describe en V.1.2.

V. METODOS DE ANALISIS DEL RNA

V.1.1. ANALISIS DE RNA POR ELECTROFORESIS

El RNA purificado se analizó por electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes usando ya sea 10 mM de hidróxido de metilmercurio tanto en la muestra como en el gel (Bayley y Davidson, 1976) o formaldehído (Lehrach et al., 1977; Wicks, 1986).

Los geles se tiñeron con bromuro de etidio 5 μ g/ml en agua durante 5 min y se lavaron dos veces en acetato de amonio 0,5 M durante 15 min. El RNA se observó por fluorescencia usando un transiluminador Fotodyne de luz UV de 310 nm. Alternativamente, el RNA se tiñó directamente en el

buffer de muestra antes de la electroforesis por el procedimiento de Sheiness y Sullivan (1986).

V.1.2. DETECCION DE RNAs VIRALES POR NORTHERN BLOT

En caso de hibridaciones de RNA por *Northern blot*, los geles de agarosa descritos en el párrafo anterior se lavaron para eliminar el agente desnaturalizante (con 14 mM β -mercaptoetanol para geles con hidróxido de metilmercurio y con agua para los de formaldehído). Se trataron con NaOH 50mM - NaCl 10 mM durante 30 min a temperatura ambiente y se transfirieron a membranas de nylon (Gene Screen™, New England Nuclear, Boston, EE.UU.) durante 6 a 12 hs con buffer fosfato 25 mM pH 6,5.

La transferencia del RNA se constató por fluorescencia de bromuro de etidio en las membranas de nylon (Denis et al., 1988). La fijación del RNA se efectuó por tratamiento del nylon a 80°C durante 2 hs. (Sambrook et al., 1989) o por "crosslinking" con luz UV de longitud de onda 310 nm durante 45 seg. (Kandjian, 1986).

Las membranas se prehibridaron a 45°C durante 4 hs en 6X SSC - 5X Denhardt - SDS 1% - 0,5 mg/ml tRNA de levadura y se hibridaron a 45°C (si se usaron sondas de DNA) o 65°C (si se usaron ribosondas) durante 12-24 hs usando el mismo buffer de prehibridación.

Los lavados se efectuaron de acuerdo a lo recomendado por los fabricantes de Gene Screen: 2 lavados de 5 min a temperatura ambiente con 6X SSC, 2 lavados de 30 min a 65°C con 2X SSC - SDS 1% y 2 lavados de 15 min a temperatura ambiente con 0,2X SSC - SDS 0,025%.

V.2. PREPARACION DE TRANSCRIPTOS *IN VITRO*

Ya sea para ser usados como sondas en experimentos de *Northern blot* o en ensayos de protección a RNasas se prepararon RNAs radiactivos por transcripción *in vitro* usando las RNA polimerasas de los fagos T7, T3 y SP6 de acuerdo a las condiciones descritas por Melton et al. (1985). Los vectores de clonado usados fueron pBS SK⁺ (Bluescript™, Stratagene, La Jolla, EE.UU.) o pGEM3 (Promega, Madison, EE.UU.) (ver apéndice 3).

Las RNA polimerasas fueron provistas por New England Biolabs (Beverly, EE.UU.). La reacción se llevó a cabo en presencia de 80 μ Ci de

α [^{32}P]ATP. Las sondas se purificaron por precipitación etanólica en presencia de 2,5 M de acetato de amonio (para *Northern blot*) o por elución después de realizar una electroforesis en geles de poliacrilamida (para obtener transcritos de tamaño definido para mapeo por RNasas).

V.3. ESTUDIO DE LOS EXTREMOS 5'

V.3.1. ANALISIS POR PRIMER EXTENSION

Con el objeto de analizar el extremo 5' de los RNAs derivados del RNA S de los virus estudiados se extendieron sobre RNA viral o celular, usando transcriptasa reversa, oligonucleótidos complementarios de las secuencias a estudiar.

Los oligonucleótidos usados fueron:

5'GGCATCCTTCAGAACAT3' complementario a las formas antigenómicas del virus Junín entre los nucleótidos 170-186.

5'TACTACACCCTTAATGATGGCAATGAGACTGACTGCAACAAGAGCAATATTC3' complementario a las formas genómicas del virus Junín entre los nucleótidos 145-195.

5'TTTACTGGATAGAAT3' complementario a las formas antigenómicas del virus LCM entre los nucleótidos 60-74.

5'TTGGACAAAGACATT3' complementario a las formas genómicas del virus LCM entre los nucleótidos 60-74.

Estos oligonucleótidos se fosforilaron en su extremo 5' con polinucleótido quinasa del fago T4 y γ [^{32}P]-ATP de alta actividad específica (9000 Ci/mmol) de acuerdo a Ausubel *et al.* (1989). Los productos fosforilados (que contenía una mezcla de tamaños del oligonucleótido deseado e impurezas del proceso de síntesis del mismo) y las formas no fosforiladas se resolvieron por electroforesis en poliacrilamida al 20% con 8 M urea. En estas condiciones la fracción del tamaño correspondiente al oligonucleótido completo alcanza a separarse de la forma del mismo tamaño no fosforilada (de menor movilidad electroforética), siendo detectadas ambas especies por efecto de sombreado al ser observado el gel con luz UV sobre una placa fluorescente. Así puede purificarse un oligonucleótido marcado con la máxima actividad específica posible por aislamiento de la zona del gel que lo contiene. La urea se eliminó sometiendo la muestra a una nueva electroforesis en poliacrilamida al 20% sin urea y el oligonucleótido se eluyó en agua durante una noche a 50°C. El buffer de corrida contenido en

el gel (TBE) no interfirió con las reacciones posteriores en las que se usó el oligonucleótido.

Para la reacción de extensión de primer se usó entre 0,5 y 1 μ g de RNA de viriones y de 5 a 10 μ g de RNA total de células infectadas o no infectadas (control negativo). El RNA se desnaturalizó por calor en presencia de 50 ng de primer en un volumen de 10 μ l y se incubó durante 5 min con hidróxido de metilmercurio 10 mM, al cabo de lo cual este se eliminó por agregado de β -mercaptoetanol hasta 14 mM final. La reacción de extensión se llevó a cabo en presencia de exceso de desoxinucleótidos (1 mM), 1,5 unidades/ μ l de RNAsin (Promega, Madison, EE.UU.) y 14 unidades de transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar (Promega, Madison, EE.UU.) en buffer 25 mM TRIS-HCl pH 7,5, KCl 60 mM, $MgCl_2$ 10 mM, ditiotreitól 1 mM. La reacción se incubó durante 90 min a 42°C, deteniéndose por extracción con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). La fase acuosa de la mezcla se llevó a 2,5 M de acetato de amonio y los ácidos nucleicos se precipitaron con 2,5 volúmenes de etanol durante 30 min a -70°C y por centrifugación a 4°C y a 14.000xg durante 15 min en una microcentrífuga. El pellet se secó al vacío y se resuspendió en buffer de muestra con 80% de formamida, se desnaturalizó por tratamiento a 100°C 3 min. y los extendidos se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida-urea, detectándose por autorradiografía a -70°C usando pantallas amplificadoras.

V.3.2. CLONADO DEL EXTREMO 5' POR AMPLIFICACION DE DNA POR REACCION DE POLIMERASA EN CADENA (PCR)

Con el objeto de clonar los productos de extensión de primers obtenidos se procedió a la amplificación de dichas secuencias por el método de PCR (Saiki *et al.*, 1988).

El esquema experimental, basado en el método de Domec *et al.* (1990), se muestra en la figura 6.6.

Los *primers* usados se diseñaron de manera de no tener secuencias reconocibles fuera de la zona a hibridar y siguiendo los principios de Sommer y Tautz (1989). Uno de ellos es el mismo que se usó para las extensiones con transcriptasa reversa sobre RNA antigenómico. El otro fue diseñado para hibridar en el alargue de poli C no templado que se hizo al cDNA. Su secuencia es:

El producto de extensión de primer obtenido de la manera ya descrita se eluyó de geles de poliacrilamida - urea. La urea se eliminó por pasaje a través de columnas de Sephadex G-25 (Pharmacia, Uppsala, Suecia). El cDNA eluido se precipitó con etanol con la ayuda de 5 μg de polímero lineal de acrilamida en la muestra.

El extremo 3' del cDNA se extendió por agregado de dC por medio de desoxinucleotidil transferasa terminal de timo de ternero (Promega, Madison, EE.UU.) en el buffer provisto por los fabricantes de la enzima y en presencia de 125 μM de dCTP. La reacción se desarrolló a 37°C durante 45 seg. con el fin de producir extensiones de unos 20 nucleótidos de acuerdo a experimentos de cinética de incorporación de dCTP llevados a cabo previamente. El producto de esta reacción se purificó nuevamente por filtración a través de Sephadex G-25 para eliminar los nucleótidos libres que podrían interferir con la reacción de PCR.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μl , usando 0,125 unidades de Taq polimerasa de Perkin Elmer-Cetus o de Promega Biotec, 0,2 a 1,0 μM de cada primer y los buffers provistos por los fabricantes.

Los cambios de temperatura se realizaron en un reactor térmico de Hybaid con el siguiente programa :

5 ciclos de	30 seg. 92°C
	60 seg. 26°C
	60 seg. 72°C
30 ciclos de	30 seg. 92°C
	60 seg. 45°C
	60 seg. 72°C

Los primeros 5 ciclos permiten la hibridación del primer Cla-Eco-poli G a la extensión de poli C. Los siguientes ciclos, más estrictos en cuanto a la temperatura de hibridación, amplifican el producto de los primeros ciclos. Finalizados los ciclos de temperatura se agregaron a la mezcla de amplificación 0,5 unidades del fragmento de Klenow de DNA polimerasa incubando 30 min. a 37°C. Este procedimiento permite producir extremos romos en el DNA.

Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa de alta pureza (NuSieve™ de FMC Marine Colloids, Rockville, EE.UU.) de manera de permitir su purificación y posterior clonado.

EE.UU.) de manera de permitir su purificación y posterior clonado.

El clonado se realizó usando el plásmido pUC9 (en los sitios SmaI para extremos romos y EcoRI-HindII para clonado orientado).

V.4. ESTUDIO DE LOS EXTREMOS 3'

V.4.1. ENSAYO DE PROTECCION A RNasas

Para determinar el extremo 3' de los RNAs virales se efectuó el ensayo de protección a RNasas de acuerdo a Sambrook *et al.* (1990).

5 a 10 μ g de RNA de células infectadas, no infectadas o viriones se coprecipitaron con 25000-50000 cpm de sonda de RNA (estimado por efecto Cerenkov) por agregado de etanol, tal como se ha descrito. El pellet de RNA, luego de secarse al aire, se resuspendió en 30 μ l de solución de hibridación (PIPES 40 mM pH 6,4, NaCl 0,4 M, EDTA 1 mM y 80% de formamida). Se calentó a 90°C durante 10 min para desnaturalizar el RNA y se incubó a 50°C durante 16 hs en un tubo eppendorf siliconado de 0,5 ml, cubriendo la superficie del líquido con aceite mineral para evitar evaporación. Al cabo de ese tiempo se agregaron 300 μ l de solución de RNasas (10 mM TRIS-HCl pH 7,8, 0,3 M NaCl, 5 mM EDTA, 40 μ g/ml RNasa A y 2 μ g/ml RNasa T1) incubándose durante 45 min a 28°C. En estas condiciones los híbridos RNA-RNA no son degradados. La digestión se detuvo por agregado de 10 μ l de SDS 10% y 10 μ l de solución de proteinasa K de 10 mg/ml. Al cabo de 30 min de incubación a 37°C, la reacción se extrajo con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y se precipitó con etanol usando 10 μ g de tRNA de levadura como *carrier*. El pellet que se obtuvo se resuspendió en buffer de muestra con 80% de formamida, se desnaturalizó por tratamiento a 100°C 3 min. y los fragmentos protegidos se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida-urea, detectándose por autorradiografía a -70°C con pantallas amplificadoras.

3. CLONADO Y SECUENCIACION DEL GEN DE LA PROTEINA DE LA NUCLEOCAPSIDE

3.1. Crecimiento del virus Junín en células BHK-21 y preparación de RNAs de viriones

Con el fin de obtener viriones para purificar el RNA, se infectaron células BHK-21 con un inóculo obtenido a partir de una placa de lisis aislada. El inóculo, de bajo número de partículas interferentes, se diluyó en medio de cultivo y se usó para infectar a mdí de 0,01. A cada día postinfección se realizaron titulaciones del virus en el sobrenadante. La fig. 3.1 muestra la curva de crecimiento viral.

Los días 3, 4 y 5 postinfección (de mayor título) fueron los que se utilizaron para purificar viriones. Experimentos a gran escala, utilizando 16 frascos de 175 cm² infectados permitieron obtener una cantidad de viriones suficientes para purificar RNA, cuyo rendimiento es escaso en cultivos de este virus, de crecimiento lento y baja productividad.

Los viriones concentrados por centrifugación y extraídos con tiocianato de guanidinio, según materiales y métodos, permitieron obtener el RNA viral, que fue analizado en geles de agarosa con hidróxido de metil mercurio como agente desnaturalizante (fig. 3.2.). Además de los RNAs S y L característicos, los viriones contienen también los RNA 18 y 28S. La existencia de especies de RNA adicionales puede deberse a la presencia de RNAs o RNP celulares que no fueron separados de los viriones, que fueron sometidos a un solo paso de ultracentrifugación. No obstante, este tipo de preparación era muy conveniente por su rapidez y la calidad del RNA aislado era adecuada para su uso en la síntesis de cDNA.

3.2. Preparación de cDNA a partir de RNA de viriones

La síntesis y clonado del cDNA correspondiente al gen N del virus Junín se llevó a cabo en dos etapas. El primer grupo de clones se obtuvo usando el oligonucleótido 5'-CGCACAGTGGATCCTAGGC-3', que es complementario a los extremos 3' conservados en todos los RNAs S y L de los arenavirus conocidos (Auperin *et al.*, 1982a; 1982b). En la segunda, se usó un oligonucleótido diseñado en base a la secuencia de nucleótidos obtenida a partir de los primeros clones. La estrategia de clonado se muestra en la fig. 3.3.

Los clones derivados del primer cDNA, insertado en el plásmido pUC9, se detectaron por hibridación de las colonias usando como sonda el mismo oligonucleótido (marcado con ³²P en su extremo 5') o un cDNA corto generado

Figura 3.1. Curva de crecimiento del virus Junín en células BHK-21 y VERO.

Las monocapas de células se infectaron con 0.01 ufp/célula y se titularon los sobrenadantes de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos.

Figura 3.2. RNA del virus Junín.

Electroforesis en gel de agarosa 1.2% desnaturalizante (hidróxido de metilmercurio 10 mM) de los RNAs extraídos de viriones del virus Junín (cepa MC2). Se indican los rRNAs 18 S y 28 S y los RNAs S y L del genoma viral. Los otros RNAs visibles pueden corresponder a formas defectivas de los RNAs virales, tal como se han hallado en otros arenavirus (Romanowski y Bishop, resultados no publicados).

Figura 3.3. Estrategia de clonado del gen N.

La barra negra representa el RNA S. Los clones obtenidos a partir de los primers P1 (secuencia conservada del extremo 3' del RNA S de los arnavirus) y P2 (sintetizado a partir de la secuencia del clon pJUN63) se indican como barras blancas. Estos cDNAs fueron subclonados y secuenciados de acuerdo al método de Sanger (→) o de Maxam y Gilbert (---→).

Figura 3.4. Northern blot de RNAs virales.

Los clones de cDNA obtenidos se usaron como sondas radiactivas (marcadas con ^{32}P por *nick translation* para hibridar RNAs virales y poder asignar la identidad del segmento de RNA del cual provenían.

a y b. Hibridaciones usando el clon pJUN85, correspondiente al RNA L del virus Junín (no descripto en esta tesis).

c y d. Hibridación usando pJUN63, correspondiente al RNA S del virus Junín.

Las cantidades de RNA transferido es mayor en b y d respecto de a y c.

con el mismo a partir de RNA en presencia de $\alpha^{32}\text{PdATP}$. Los clones de *E.coli* detectados que contenían esta secuencia se amplificaron en cultivos líquidos, y los plásmidos purificados se usaron como sondas para asignarlos al RNA S o L por Northern blot (Fig. 3.4).

El clon de mayor tamaño, pJUN63 se secuenció parcialmente por el método de Maxam y Gilbert y por el método de Sanger luego del subclonado en el fago M13 (mpl8 o mpl9). De esta secuencia se eligió una zona terminal a partir de la cual se diseñó un oligonucleótido que hibridaría con el RNA S viral entre los nucleótidos 929 y 947.

El cDNA generado a partir de este *primer* permitió obtener varios clones. Para la detección de los mismos se usó el extremo del inserto de pJUN63 como sonda radiactiva, de modo de identificar clones que tuvieran superposición parcial con pJUN63 en la región correspondiente al *primer* usado en esta segunda síntesis. La mayoría de los clones tenía un tamaño bastante definido de aproximadamente 900 pares de bases. Uno de ellos, pJUN42, que fue subclonado en el fago M13, permitió completar la secuencia 1849 bases a partir del extremo 3' del RNA S viral confirmando la secuencia nucleotídica en la zona de superposición de los clones pJUN63 y pJUN42.

La secuencia completa analizada se muestra en la fig. 3.5.

3.3. Análisis de la secuencia de los primeros 1849 nucleótidos del extremo 3' del RNA S viral

La secuencia obtenida presentaba una relación porcentual de 24% A, 25,4% C, 21,3% G y 29,3% U, en el RNA viral.

El análisis de marcos de lectura abiertos en la forma viral, no mostró ninguna proteína codificada. Por el contrario, analizando la forma viral complementaria se deduce un marco de lectura abierto de 1692 nucleótidos que comienza en un codón de iniciación (AUG) en la posición 82-84 y finaliza en un codón de terminación UAA en la posición 1775-1777. Esto muestra una estrategia de codificación con polaridad negativa para la mitad 3' del RNA viral analizado en esta tesis.

El polipéptido resultante tiene un peso molecular calculado de 63.033 Da. Este resultado concuerda con el peso molecular estimado para la proteína de la nucleocápside viral en base a su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida con SDS (Martínez Segovia y De Mitri, 1977; Grau et al., 1981; Rustici, 1984). La identidad del producto que codifica el gen N se

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
CGCACAGTGGATCCTAGGCATAGTGTCTAACACTTTCACTGAGCAATTTTCTCAGATCAAAACCACCAGATCTTCTGGCATGGCACACTCCAAAGAGG
M A H S K E V

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TTCCAAGCTTTAGATGGACTCAGTCCTTAAGGAGAGGTTTGAAGTCAATTTACTCAGACTGTCAAGTCGGATGTTCTGAAGGATGCCAAGCTAATTGCTGA
P S F R W T Q S L R R G L S Q F T Q T V K S D V L K D A K L I A D

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
CAGCATTGACTTCAACCAAGTGGCACAGGTGCAGCGGGCACTCAGAAAGACTAAAGGGGGGAAGAAGACCTCAATAAGTTGAGGGACCTGAATAAAGAG
S I D F N Q V A Q V Q R A L R K T K R G E E D L N K L R D L N K E

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
GTTGACAGACTCATGTCCATGAGGAGTGTTCACGAAACACGGTTTCAAGGCGGGAGATCTGGGGAGGGTTGAGCGGATGGAGTTGGCGTCTGGCCTTG
V D R L M S M R S V Q R N T V F K A G D L G R V E R M E L A S G L G

410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
GGAATTTAAAAACCAAGTTTGAAGAGCAGAGACAGGCTCTCAAGGGGTTTACATGGGTAACCTTGCTCAGTCACAAGTGGCCAAGAGATCAGAGATATT
N L K T K F R R A E T G S Q G V Y M G N L S Q S Q L A K R S E I L

510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
GAGAACACTGGGATTTCAACAGCAAGGAACCTGGGGGAAATGGTGTGGTGAGGGTATGGGATGTTAAAGATCCTTCAAAACTTAACAATCAGTTTGGTTCT
R T L G F Q Q Q G T G G N G V V R V W D V K D P S K L N N Q F G S

610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
GTTCTGACATTTGCAATTTGCATGCATGTTCAAGGAGGTGAGACAAATGAACAGTGTGCATACAGGCTTTAACCTCTCTTGGGCTTCTATACACTGTGA
V P A L T I A C M T V Q G G E T M N S V I Q A L T S L G L L Y T V K

710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
AGTATCCAACCTTGAGTGACCTTGACAGATTGACTCAGGAACATGACTGCCTCCAGATTGTGACTAAGGATGAAAGCTCCATCAACATTTCTGGCTACAA
Y P N L S D L D R L T Q E H D C L Q I V T K D E S S I N I S G Y N

810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
CTTTAGTCTTTTCACTGCTAGTAAAGGCTGGTGCATCCATTCTTGATGATGGAATATGTTGGAGACAATCAGATCAGCCCAAGATACTTTCTTCCCTC
F S L S A A V K A G A S I L D D G N M L E T I R V T P D N F S S L

910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000
ATAAAATCAACCTTCAAGTTAAACGAAGAGAAGGCATGTTTATTGATGAGAAACAGGCAATAGAAACCTTATGAAACCTTCTGTACAACTTTGCTG
I K S T I Q V K R R E G M F I D E K P G N R N P Y E N L L Y K L C L

1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080    1090    1100
TTTCTGGCGATGGTTGGCTTATATTGGTTCCAGATCACAATATCATAGGAGGTCATGGGACAACAAGTATTGATCTGACAAGGAACAGTGTGCTGG
S G D G W P Y I G S R S Q I I G R S W D N T S I D L T R K P V A G

1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
ACCTAGACAACCGGAAAGAACGGTCAAGATTTGAGATTGGCTAAGTGCAGAGATACAAGAAGCTGTATCAGAGAGGCAAGTGGGGAACCTGACCC
P R Q P E K N G Q N L R L A N L T E I Q E A V I R E A V G K L D P

1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280    1290    1300
ACCAATACCTTTGGCTGCACATTGAAGGACCACTACTGACCTGTGAGATGGCGTTGTTCCAGCTGCAGGTAGCAAGTATATTCACTGCTTCAGAA
T N T L W L D I E G P A T D P V E M A L F Q P A G S K Y I H C F R K

1310    1320    1330    1340    1350    1360    1370    1380    1390    1400
AACCACATGATGAGAAAGGGTTTAAAAATGGTAGCAGACACTCTCACGGCATCTTAATGAAAGACATAGAAGATGCAATGCCAGGAGTTCTTAGTACGT
P H D E K G F K N G S R H S H G I L M K D I E D A M P G V L S Y V

1410    1420    1430    1440    1450    1460    1470    1480    1490    1500
GATTGGCTTGCTGCCTCCGGACATGGTTGTGACCACTCAAGGGTCCGATGACATCAGGAAGTTGTTTGACCTCCATGGAAGAAGAGATCTTAAGCTGGT
I G L L P P D M V V T T Q G S D D I R K L F D L H G R R D L K L V

1510    1520    1530    1540    1550    1560    1570    1580    1590    1600
GATGTTAGGCTTACATCAGAACAGCCAGGCTGACCAACAGGTCTGGGAGAAATTTGGCCACCTATGCAACATCACAATGGAGTGGTTGTCAGCA
D V R L T S E Q A R Q F D Q Q V W E K F G H L C K H H N G V V V S K

1610    1620    1630    1640    1650    1660    1670    1680    1690    1700
AGAAAAAGAGAGATAGGATGCTCCCTTTAAGTTGGCTCCAGTGAGCCACACTGTGCTCTGCTAGACTGCATAATGTTTCAGTCAGTGTGGATGGGAA
K K R D K D A P F K L A S S E P H C A L L D C I M F Q S V L D G K

1710    1720    1730    1740    1750    1760    1770    1780    1790    1800
GCTCTATGAAGAAGAACTTACACCTCTATTACCACCGAGCTTGCTGTTCTCCCGAAGGCAGCCTATGCACTGTAAGCAGTGCCTCCCGAGTCCGCGGCC
L Y E E E L T P L L P P S L L F L P K A A Y A L *

1810    1820    1830    1840
AGGCCGCGGACTGGGGGGCACACCAGCCCGGGCAATGCCCGGGCTGG 3'

```

Figura 3.5. Secuencia de los nucleótidos 1 a 1849 desde el extremo 3' del RNA S del virus Junín (cepa MC2)

Se indica la forma viral complementaria (antigenómica) con el marco de lectura abierto para el gen N. Las secuencias subrayadas corresponden a los primeros 19 nucleótidos conservados en los arenavirus. Las flechas (→ ←) corresponden a la región no codificante con autocomplementariedad (vease figura 3.11).

Tabla 3.1. Uso de codones en el gen N del virus Junín.

CODON	No	%	CODON	No	%	CODON	No	%	CODON	No	%
UUU-Phe	13	2.3	UCU-Ser	9	1.6	UAU-Tyr	6	1.1	UGU-Cys	1	0.2
UUC-Phe	6	1.1	UCC-Ser	9	1.6	UAC-Tyr	5	0.9	UGC-Cys	6	1.1
UUA-Leu	5	0.9	UCA-Ser	9	1.6	UAA-***	1	0.2	UGA-***	0	0.0
UUG-Leu	18	3.2	UCG-Ser	1	0.2	UAG-***	0	0.0	UGG-Trp	6	1.1
CUU-Leu	15	2.7	CCU-Pro	9	1.6	CAU-His	4	0.7	CGU-Arg	0	0.0
CUC-Leu	10	1.8	CCC-Pro	2	0.4	CAC-His	7	1.2	CGC-Arg	0	0.0
CUA-Leu	5	0.9	CCA-Pro	10	1.8	CAA-Gln	14	2.5	CGA-Arg	2	0.4
CUG-Leu	12	2.1	CCG-Pro	4	0.7	CAG-Gln	16	2.8	CGG-Arg	2	0.4
AUU-Ile	13	2.3	ACU-Thr	11	1.9	AAU-Asn	11	1.9	AGU-Ser	8	1.4
AUC-Ile	6	1.1	ACC-Thr	7	1.2	AAC-Asn	14	2.5	AGC-Ser	7	1.2
AUA-Ile	7	1.2	ACA-Thr	10	1.8	AAA-Lys	19	3.4	AGA-Arg	21	3.7
AUG-Met	14	2.5	ACG-Thr	1	0.2	AAG-Lys	21	3.7	AGG-Arg	11	1.9
GUU-Val	18	3.2	GCU-Ala	10	1.8	GAU-Asp	20	3.5	GGU-Gly	11	1.9
GUC-Val	6	1.1	GCC-Ala	5	0.9	GAC-Asp	18	3.2	GGC-Gly	10	1.8
GUA-Val	2	0.4	GCA-Ala	13	2.3	GAA-Glu	14	2.5	GGA-Gly	11	1.9
GUG-Val	11	1.9	GCG-Ala	3	0.5	GAG-Glu	15	2.7	GGG-Gly	10	1.8

analiza en el capítulo 4.

Más allá del $_{82}\text{AUG}_{84}$ se encuentran otros codones de iniciación en las posiciones 313-315, 319-321, 379-381 y 454-456 que permitirían traducir proteínas de pesos moleculares desde 50 kDa. Sin embargo, es esperable que solamente el codón de iniciación de posición 82-84 sea funcional debido a que se encuentra en un entorno favorable para el comienzo de la traducción dado por la secuencia **CTGGCAUGG** que cumple con el consenso deducido por Kozak (1984).

El uso de codones en el marco de lectura abierto se resume en la Tabla 3.1. No todos los aminoácidos presentan preferencias de codón.

3.4. Secuencia primaria de la proteína N

A partir de la secuencia de aminoácidos deducida, la carga neta del polipéptido es + 14.5 a pH neutro considerando una carga + 1/2 para His, y + 1 para Lys y Arg a pH neutro. Este dato está relacionado con el alto contenido en aminoácidos básicos Arg y Lys, que se hallan dispersos en toda la proteína N en forma de residuos aislados o en grupos de hasta cuatro restos de aminoácidos (Fig. 3.6).

Esta abundancia de aminoácidos básicos se halla relacionada con la función de la proteína N que primariamente es capaz de asociarse al RNA viral (y viral complementario) formando la nucleocápside del virus.

Los restantes aminoácidos se indican en la Tabla 3.2.

A partir del análisis por computadora de la secuencia primaria de la proteína N se establecieron varios parámetros referentes a la estructura secundaria de la proteína y sus características fisicoquímicas. Los mismos se graficaron en función de la posición de cada residuo de aminoácido en las figuras 3.7 a 3.10. Los algoritmos usados fueron principalmente los de Chou y Fasman (1979) y Kyte y Doolittle (1982). Una explicación amplia de los mismos puede hallarse en Fasman (1989).

La proteína N presentaría varias regiones de α hélice y β plegada. En la fig. 3.7 se observa que la región comprendida entre los primeros 120 aminoácidos desde el extremo aminoterminal presenta una estructura rígida con pocas probabilidades de formar vueltas (*random coil turns*); esta misma región presenta una mayor proporción de α hélice y una mayor hidrofiliidad, siendo probable que sea una zona cercana a la superficie de la molécula.

En cambio, el resto de la molécula al tener una mayor presencia de

```

1  MAHSKEVPSF RWTQSIRRGL SQFTQTVKSD VLKDAKLIAD SIDFNQVAQV
51  QRALRRTKRRRG EEDLNKLRDL NKEVDRLLMSM RSVQRNTVFK AGDLGRVERM
101 ELASGLGNLK TKRRRAETGS QGVYMGNLSQ SQLAKRSEIL RTLGFQQQGT
151 GGNGVVRVWD VKDPSKLNNQ FGSVPALTIA CMTVQGGETM NSVIQALTSL
201 GLLYTVKYPN LSDLDRLTQE HDCLQIVTKD ESSINISGYN FSLSAAVKAG
251 ASILDDGNML ETIRRVTPDNF SSLIKSTIQV KRREGMFIDE KPGNRNPYEN
301 LLYKLCLSGD GWPYIGSRSQ IIGRSWDNTS IDLTRRKPVAG PRQPEKNGQN
351 LRLANLTEIQ EAVIRREAVGK LDPTNTLWLD IEGPATDPVE MALFQPAGSK
401 YIHCFRRKPHD EKGFKNGSRH SHGILMKDIE DAMPGVLSYV IGLLPDMVV
451 TTQGSDDIRRK LFDLHGRRDL KLVDVRLTSE QARRQFDQQVW EKFGHLCKHH
501 NGVVVSKKKR DKDAPFKLAS SEPHCALLDC IMFQSVLDGK LYEEELTPLL
551 PPSLLFLPKA AYAL*

```

Figura 3.6. Estructura primaria del producto de traducción del gen N.

Los aminoácidos básicos (lisina=K y arginina=R) se indican recuadrados. Se nota la dispersión de los mismos en la secuencia y la formación de grupos de hasta cuatro residuos básicos.

TABLA 3.2.: Composición porcentual de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de la proteína N del virus Junín

Aminoacido	%	Aminoacido	%	Aminoacido	%
Gly	7,4	Phe	3,4	Pro	4,5
Leu	11,6	Tyr	2,0	Cys	1,3
Ileu	4,6	Trp	1,1	Glu	7,1
Val	6,6	Gln	5,3	Asp	6,4
Ala	5,5	Asn	4,4	Lys	7,1
Met	2,5	Thr	5,1	Arg	6,4
		Ser	7,6	His	1,9

Figura 3.7. Gráficos de estructura secundaria probable de la proteína N.

Estos gráficos se obtuvieron con el programa de análisis de secuencias de Genetic Computers Group (Madison, Wisconsin) usando los algoritmos desarrollados por Chou y Fasman (CF) para predicción de estructuras secundarias de proteínas a partir de sus secuencias de aminoácidos.

- Asignación del índice de probabilidad de formación de estructura secundaria por Chou y Fasman.
- Determinación de las zonas de probabilidad máxima de existencia de α -hélice, hoja- β y *turns* a lo largo de la secuencia.

La escala superior indica la posición de cada residuo de aminoácido.

Figura 3.8. Parámetros fisicoquímicos de la molécula de proteína N.

Los datos que se muestran se obtuvieron por el mismo procedimiento que lo descrito en la figura 3.7. Se indica el índice de hidrofobicidad de cada residuo aminoacídico a lo largo de la molécula de N (de acuerdo a Kyte y Dolittle, 1979), la flexibilidad molecular en función de la capacidad de rotación del enlace peptídico según la estructura secundaria que forme, el índice de antigenicidad potencial (no es estrictamente un parámetro fisicoquímico) y el índice de probabilidad de existencia en la superficie de la molécula de los residuos de aminoácidos.

La escala superior indica la posición de cada residuo de aminoácido.

Figura 3.9. Diagrama de la molécula de proteína N.

Los datos que se muestran se obtuvieron por el mismo procedimiento que lo descrito en la figura 3.7.

Se pone de manifiesto la estructura secundaria de la proteína N indicando la ubicación de las zonas de la misma con mayor probabilidad de encontrarse en la superficie.

La molécula se esquematizó plegada de acuerdo a la existencia de *turns* (véase figura 3.6). De todos modos es importante aclarar que esta no es necesariamente la disposición real de estos *turns* en la molécula, sino una simplificación para permitir la representación gráfica.

Los números a los lados del diagrama de la molécula indican el número de residuo aminoacídico.

Figura 3.10. Diagrama de la molécula de proteína N.

Los datos que se muestran se obtuvieron por el mismo procedimiento que lo descrito en la figura 3.7.

Se pone de manifiesto la estructura secundaria de la proteína N indicando la ubicación de las zonas hidrofílicas e hidrofóbicas de la misma. Al igual que la figura 3.9, la molécula se esquematizó plegada de acuerdo a la existencia de *turns* como una simplificación para permitir la representación gráfica.

Los números a los lados del diagrama de la molécula indican el número de residuo aminoacídico.

prolina podría considerarse como más flexible y con mayores vueltas al azar. Particularmente rica en prolina es la región carboxiloterminale, de mayor hidrofilicidad y mayor probabilidad en superficie.

La región carboxilo terminal presenta varios clusters de aminoácidos básicos, ya sea en una estructura probable de α hélice u hoja plegada (β). Entre los aminoácidos 460-530 se halla la zona de mayor probabilidad de presencia en la superficie de la molécula, coincidiendo con series de pares de Arg Lys y Arg Arg.

Analizando la secuencia se hallan algunas zonas de alta hidrofobicidad. Según Zeller *et al.* (1986), estas zonas también presentes en el virus LCM, explicarían la presencia de la proteína N en la membrana. De todos modos esto no ha sido descripto para el virus Junín.

3.5 Comparación de la proteína N del virus Junín con otros arenavirus

Una alineación ajustada de las secuencias de aminoácidos de las proteínas N conocidas de otros arenavirus pone en evidencia un alto grado de conservación. En varias regiones las secuencias son idénticas para todos los arenavirus conocidos (fig. 3.11.).

En términos generales, el porcentaje de homología es alto, del orden del 46 al 76% considerando sólo los aminoácidos idénticos en posiciones homólogas (Tabla 3.3a). Estos valores aumentan notablemente hasta un 64-87% si se consideran las sustituciones conservativas de acuerdo a Schwartz y Dayhoff (1979) (Tabla 3.3b).

La semejanza en las secuencias de las proteínas N de los arenavirus es un reflejo de la inmunoreactividad cruzada entre ellos. Varios grupos de aminoácidos conservados entre todos los arenavirus podrían corresponder a epitopes comunes. Tal es el caso de los residuos 154-163, 194-217, 232-265, 295-317, 453-463 y 523-534 de la secuencia de la proteína de la nucleocápside del virus Junín (fig. 3.11).

De igual forma pueden considerarse al menos tres bloques que corresponden a zonas de baja homología 105-123, 135-164, 228-239, 349-392 y 555-584.

Con respecto a los aminoácidos básicos, que caracterizan a esta proteína, 38 de las 76 Lys y Arg se hallan conservadas en los demás arenavirus (50% de homología). Estos se hallan dispersos en la estructura primaria de la proteína N, con una mayor concentración en la región amino y carboxilo

Figura 3.11. Comparación de las secuencias de aminoácidos de la proteína N de diferentes arenavirus.

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas N conocidas en los arenavirus se alinaeron usando el programa Clustal. Las similitudes y cambios conservativos se refieren a la secuencia de la proteína N del virus Junín. Los bloques negros en la posición de cada aminoácido indican similitud. Los bloques punteados indican un cambio conservativo de acuerdo a Dayhoff y Schwartz (1979) (véase apéndice 2)

REFERENCIAS

- MC2: virus Junín cepa MC2
- MOP: virus Mopeia (Wilson y Clegg, 1991)
- LAG: virus Lassa cepa Nigerian (Clegg et al., 1990)
- LAS: virus Lassa cepa Josiah (Clegg y Oram, 1985)
- LCW: virus LCM cepa WE (Romanowski et al., 1985)
- LCA: virus LCM cepa ARM (Romanowski y Bishop, 1985)
- TAC: virus Tacaribe (Franze Fernández et al., 1987)
- PIC: virus Pichinde (Auperin et al., 1984a)

A

	TAC	PIC	LCM	LAS
JUN	76	54	49	47
TAC		54	48	48
PIC			49	49
LCM				60

N

B

	TAC	PIC	LCM	LAS
JUN	87	70	66	65
TAC		69	64	64
PIC			65	66
LCM				73

N

Tabla 3.3. Porcentaje de homología de la proteína N de diferentes arenavirus.

a. Considerando cambios de aminoácidos.

b. Considerando cambios conservativos de acuerdo a Schwartz y Dayhoff (1979)

terminal como residuos aislados, nueve grupos de dos y uno de tres residuos básicos. En particular, se encuentra un grupo de cuatro residuos básicos, seguido de una zona hidrofílica, conservado en todos los arenavirus cerca del carboxilo terminal; esta secuencia es KKKR o KKKK, con excepción del virus Tacaribe en que es KKNK y el virus Pichindé que presenta una secuencia de cinco Lys contiguas (KKKKK).

3.6. Región no codificante posterior (*downstream*) al marco de lectura abierto del gen N

El análisis del contenido de GC en la secuencia estudiada muestra que la región 5' del RNA viral cuyo clonado se describe (región no codificante) tiene un promedio mayor que el resto.

Analizando con detalle la misma se observó que es posible establecer una estructura secundaria formada por dos grupos de secuencias auto-complementarias formando una doble horquilla muy estable (Fig. 3.12a). El hairpin más cercano al gen N está estabilizado por 15 pares CG y 1 par AU (con un $\Delta G^\circ = -57,2$ kcal/mol de acuerdo a Tinoco *et al.* (1973). El hairpin más alejado del gen N se halla formado por 11 pares GC y 2 pares AU con $\Delta G^\circ = -39.0$ kcal/mol.

Esta estructura se consideró como original del RNA S del virus Junín al compararla con los demás arenavirus que mostraban sólo una horquilla. Sin embargo, en el momento de escribir esta tesis una reinterpretación de la región intergénica de acuerdo a la versión corregida de la secuencia del RNA S del virus Tacaribe (Iapalucci *et al.*, 1991) y el análisis de la secuencia del RNA S del virus Mopeia (Wilson y Clegg, 1991) han mostrado que es una estructura compartida por varias especies aunque sus secuencias nucleotídicas no presenten una gran homología..

En la Fig. 3.12b se muestra la estructura comparativa de distintas regiones intergénicas. En nuestro laboratorio, se determinó la secuencia completa del RNA S del virus Junín (cepa MC2), confirmando esta secuencia como no codificante entre los genes N y GPC (Ghiringhelli *et al.*, 1991).

Figura 3.11. Estructura de la región intergénica del virus Junín y otros arenavirus.

Se indica la estructura probable de la región intergénica de los arenavirus. La estabilidad de cada horquilla se indica en función de su ΔG^0 en kcal/mol (Tinoco *et al.*, 1973)

Las referencias de las abreviaturas se encuentran en la figura 3.10. La reinterpretación de la región intergénica del virus Tacaribe muestra una estructura semejante a la del virus Junín (Iapalucci *et al.*, 1991)

3.7. Región no codificante previa (*upstream*) al marco de lectura abierto del gen N

Los primeros 82 nucleótidos de la secuencia viral muestra una zona no codificante. La secuencia real de los primeros 19 nucleótidos no fue establecida, suponiéndose una alta homología con el oligonucleótido usado para la síntesis del cDNA.

En el capítulo 6 se analiza la secuencia de la región 5' del RNA S viral complementario, a partir de la cual se deduce la secuencia de los mencionados primeros 19 nucleótidos.

3.8. DISCUSION

A partir de los datos obtenidos de la secuencia de los primeros 1849 nucleótidos del extremo 3' del RNA S viral, se observa una organización parecida a la del resto de los arenavirus cuyo genoma se conoce (Auperin *et al.*, 1984b; Romanowski *et al.*, 1985; Clegg y Oram, 1985; Franze-Fernández *et al.*, 1987; Wilson y Clegg, 1991).

La mitad 3' del RNA S no presenta marcos de lectura abiertos en esa polaridad, pero en el primer triplete AUG de la forma viral complementaria (antigenómica) comienza un marco de lectura abierto que codifica para una proteína de peso molecular calculado de 63.033 Da. Esto muestra una estrategia de codificación negativa para la mitad 3' del RNA S, tal como se observa en el resto de los arenavirus.

El polipéptido codificado en el gen descripto, se asignó a la proteína de la nucleocápside viral a partir de la comparación realizada con las secuencias de las proteínas conocidas de los demás arenavirus. El producto de este gen (gen N) se confirmó como la proteína N en los análisis de expresión del gen clonado realizados en los siguientes capítulos.

El análisis de la secuencia de la proteína N muestra una alta homología con respecto a los demás miembros de la familia en estudio. Desde el punto de vista evolutivo, esta alta conservación de secuencia (con un mínimo de 64% respecto a LCM, hasta un máximo de 87% de homología con Tacaribe, considerando los cambios de aminoácidos estructuralmente semejantes) es una de las características de la mayoría de las proteínas que determinan estructuras combinadas con RNA. Por otra parte, concuerda con la reacción cruzada que exhibe, ya sea por el uso de anticuerpos monoclonales o por ensayo de

fijación de complemento, entre diferentes miembros de la familia de los arenavirus (Rowe *et al.*, 1970; Buchmeier y Oldstone, 1978; De Mitri y Martínez Segovia, 1980; Buchmeier *et al.*, 1981; Sánchez *et al.*, 1989, Ruó *et al.*, 1991).

En particular, es notable la conservación de los aminoácidos básicos (Arg y Lys) y de Cys. Los primeros mantienen 38 posiciones comunes a todos los arenavirus (el 50% del total de aminoácidos básicos), muy probablemente relacionadas con la estructura y la función de la proteína N. El mantenimiento de las posiciones de Cys (5 sobre un total de 7) implicaría el mantenimiento de la estructura del plegado de la proteína. Tanto las Cys como los aminoácidos básicos se hallan conservados preferentemente en los extremos amino y carboxilo terminal, cerca de zonas que muy probablemente se hallen en la superficie de la molécula de proteína.

Los aminoácidos Arg y Lys, que dan un carácter fuertemente básico a la proteína N, deberían estar implicados en la interacción de N con el RNA viral. Este complejo ribonucleoproteico que forma la nucleocápside se completa con la proteína L y probablemente la proteína Z. La situación de los aminoácidos básicos en este caso debería relacionarse con la superficie de la molécula con el fin de permitir dicha interacción. Sin embargo, las regiones analizadas no muestran homología con las secuencias de unión a RNA descritas para ribonucleoproteínas (Dreyfuss, 1986; Dreyfuss *et al.*, 1988; Swanson y Dreyfuss, 1988; Bandziulis *et al.*, 1989). Para una completa resolución de las secuencias que intervienen en la unión al RNA será necesario encarar estudios de ensamblado de RNA y proteína N como los realizados en influenza (Kingsbury *et al.*, 1987) y estudios de unión de RNA usando el gen N clonado con deleciones o mutaciones puntuales definidas en las regiones mencionadas.

La importancia de los aminoácidos básicos podría extenderse también al reconocimiento de estructuras secundarias del RNA tal como se describe para las proteínas Tat y Rev de HIV (Le *et al.*, 1990; Olsen *et al.*, 1990; Subramanian *et al.*, 1990) y más específicamente a la proteína N (antiterminador) del bacteriófago lambda, la cual presenta regiones ricas en Arg, necesarias para el reconocimiento de estructuras en horquilla en RNAs (Lazinski *et al.*, 1989). Todas las proteínas citadas, además de algunas proteínas ribosomales, presentan una secuencia consenso rica en Arg o Lys. En la nucleoproteína del virus Junín se identifica la secuencia RALRKTKRGE, conservada en el resto de los arenavirus entre los aminoácidos 52-61. En la Tabla 3.4 se indican las secuencias consenso antedichas. Este aspecto funcional será discutido con más detalle en el capítulo 6.

Tabla 3.4: Secuencias consenso de nucleoproteínas con probable capacidad de reconocimiento y unión a estructuras secundarias de RNA
(tomadas de Lazinski et al., 1989)

Nun fago HK022	RDRRRIARWEK
N fago Lambda	QTRRRERRAEK
N fago 21	KSRYKARRAEL
N fago 22	KTRRHERRRKL
Tat HIV1	RKKRRGRRRAP
Rev HIV2	SQRRNRRRRWK
E4 13kDa Ad2	RAKRRDRRRRS
Gag SSV	RERRRDRRQEK
Gag MMSV	KEKERDRRRHR
Gag FSV	ASRLRERREN
L14 <i>B.stearothermophilus</i>	RTKRGVRRPDG
S6 <i>E.coli</i>	KDERRERRDDF
S18 cloroplastos Briofitas	KSKRSSRRRMP
S19 <i>X.laevis</i>	KTSRKQKEREK
S26 rata	RNRSREARKDR
L39 rata	NSKRRHWRRTK
Arenavirus	
Junín (MC2)	QRALRKTKRGE
Mopeia	QRLVRKEKRGE
Lassa (Nigerian)	QRLVRKQKRGE
Lassa (Josiah)	QRLVRKERRGE
LCM (WE)	QRIVRKERRGE
LCM (ARM)	QRIVRKEKRGE
Tacaribe	QRVLRKTKRTE
Pichinde	QRMVRKDKRTE

Tabla 3.5: Secuencias consenso de transporte nuclear presentes en proteínas estructurales de diferentes virus.

JUNIN	VSKKKRDK
PICHINDE	LKKKKKDA
LCM	RDKKKKD-
HEPATITIS B	PRRRRSQS (*)
INFLUENZA	MKRKRNS-

(*) se repite en un tandem

Otro aspecto destacable de la abundancia de aminoácidos básicos es la presencia de regiones con alta densidad de residuos Arg o Lys. En particular, en el virus Junín se observa una secuencia KKKR compartida por los demás arenavirus (a excepción de Tacaribe que presenta la secuencia KKNKSK). A esta serie de cuatro aminoácidos básicos se agrega un quinto en Junín, LCM y Pichindé entre las posiciones 524-531. Estos consensos, son semejantes a las señales de transporte nuclear definidas para la proteína PBP2 (polymerase basic protein 2, Mukaigawa y Nayak, 1991), NS1 de influenza (Greenspan *et al.*, 1988), y para la proteína precursora del core del virus de la hepatitis B (Yeh *et al.*, 1990) (Tabla 3.5).

En este mismo sentido, la presencia de la proteína N sólo ha sido detectada con el uso de anticuerpos monoclonales en el núcleo de las células en cultivo infectadas con el virus Pichinde (Young *et al.*, 1988). Por otra parte, también se ha detectado con el uso de antisueros policlonales la presencia de proteínas virales en los núcleos de neuronas o células pancreáticas de animales infectadas con los virus LCM (Mims, 1966) como Junín (Garay, 1971; Maiztegui *et al.*, 1975), lo que podría implicar la translocación de proteínas al núcleo.

En los casos de hepatitis e influenza, esta secuencia consenso se halla duplicada o asociada a otras secuencias necesarias para el transporte. Estas secuencias duplicadas no se han identificado en los arenavirus, así como ninguna otra relacionada (Digwall y Laskey, 1986). De todos modos, la repetición de las secuencias permite la translocación total de la proteína al núcleo, y la presencia de una sola de las señales hace que la proteína sea mayoritariamente citoplasmática (Yeh *et al.*, 1990), que es lo observado en los arenavirus mencionados.

Con referencia al extremo 5' no codificante del gen N muestra una secuencia invertida con capacidad de formar una estructura secundaria muy estable en doble horquilla (fig. 3.12a). Resultados recientemente publicados indican que se halla como una región intergénica en el RNA S entre los genes N (aquí descripto) y GPC (Ghiringhelli *et al.*, 1991), lo cual concuerda con el modelo de codificación de los demás arenavirus. Sin embargo, esta estructura difiere de las regiones intergénicas de los RNAs S conocidos (que son simples) debido a la capacidad de formar una horquilla doble. En el momento de redacción de esta tesis, los resultados de Iapalucci *et al.* (1991), reinterpretando la estructura de la región intergénica del virus Tacaribe y de Wilson y Clegg (1991), con respecto a la región intergénica del virus

Mopeia, han mostrado que esta estructura es compartida por otros miembros del grupo.

Esta potencial estructura secundaria, sin embargo, requerirá un estudio más profundo con el fin de demostrar que realmente existe en los arenavirus. Resultados preliminares obtenidos por cambio de movilidad en corridas electroforéticas en geles nativos y desnaturalizantes de RNAs transcriptos *in vitro* conteniendo la región intergénica del virus Junín permitirían inferir que, al menos en soluciones del RNA puro, esta zona presenta cambios en su estructura (Rivera Pomar y Romanowski, datos no publicados).

Por otra parte, la presencia de regiones con capacidad de formar horquillas permite suponer que tiene algún tipo de función. Tuerk *et al.* (1988) han definido una serie de funciones posibles para las estructuras en horquilla. Una de ellas es la de actuar como terminadores para la transcriptasa reversa de numerosos virus; esto permitiría explicar el motivo por el cual la mayoría de los cDNAs que se obtuvieron en el clonado del genoma del virus Junín eran de un tamaño definido, cercano a la región intergénica. Para salvar dicho inconveniente, Salvato y Shimomaye (1989) han reportado una técnica de transcripción reversa a alta temperatura que les ha permitido el clonado del genoma del virus LCM por fusión de la horquilla.

Las estructuras en horquilla (*hairpins*, *stem loops*) están ampliamente distribuidas entre diversos organismos como terminadores de transcripción ρ independientes en *E.coli* (Adhya *et al.*, 1975; D'Aubenton Caraffa *et al.*, 1990) o en virus con genoma de DNA formando regiones intergénicas y señales de terminación de transcripción, tal es el caso del fago ϕ -X-174 (Hayashi *et al.*, 1983) o el fago λ (Olson *et al.*, 1984; Priano *et al.*, 1987). En virus con genoma de RNA se hallan en un amplio número de grupos como moduladores de la traducción con estructura *pseudo knot* en Tobamovirus, Tymovirus, Bromovirus, Cucumovirus, Tobravirus y otros (Zuidema, 1983; Pleij, 1990), con función de reconocimiento de trans activadores como la región TAR del virus de la inmunodeficiencia adquirida humana (HIV) (Le *et al.*, 1990; Olsen *et al.*, 1990) o como regiones de terminación de la transcripción en el bunyavirus Punta Toro (Emery y Bishop, 1987) y en los arenavirus, donde recientemente Iapalucci *et al.* (1991), demostraron la capacidad de terminación en los RNA S y L del arenavirus Tacaribe. En el capítulo 6 se describe en mayor detalle estas cuestiones en referencia a la terminación del mRNA transcripto a partir del gen N del virus Junín.

3.9. CONCLUSIONES

1. La mitad 3' del RNA S viral del virus Junín presenta un marco de lectura abierto (ORF) de polaridad negativa entre los nucleótidos 82 y 1777 (gen N) que codifica para una proteína de 63.033 Da.
2. La región no codificante por detrás del ORF tiene un alto contenido de G-C y puede formar una estructura secundaria en doble horquilla.
3. La proteína que se traduca a partir del primer codón de iniciación del ORF tiene alta homología con las proteínas N de los demás arenavirus.
4. La conservación en número y posición de la mayoría de los aminoácidos básicos y las Cys hace suponer que es una proteína cuya estructura y función también es conservada.

4. EXPRESION DEL GEN N EN CELULAS EN CULTIVO

4.1. Construcción de los plásmidos recombinantes

4.1.1. Construcción del gen N de LCM

A partir de los clones 39.50, 81.268 y 82.242 se prepararon los plásmidos recombinantes que contenían fragmentos del RNA S del virus LCM (Romanowski *et al.*, 1985). Estos fragmentos parcialmente superpuestos permitieron reconstruir el ORF completo del gen N de acuerdo a la estrategia que se muestra en la figura 4.1.

En particular, los clones 39.50 y 81.268 se digirieron con las enzimas SalI y PvuII. Los productos de digestión parcial de 1,8 kpb (39.50) y 3,8 kpb (81.268), respectivamente, se electroeluyeron de geles de agarosa y se ligaron en presencia de 5% de PEG y altas concentraciones de DNA ligasa de T4. Con esta mezcla de ligación se transformaron *E.coli* DH5 α seleccionando los clones que contenían plásmidos recombinantes por su resistencia a la tetraciclina. Seis clones elegidos al azar se analizaron realizando un patrón de restricción de sus plásmidos con la enzima HindIII. Este análisis mostró que todos contenían el ORF de N correctamente reconstruido.

Este plásmido recombinante 39.50/81.268 se cortó con las enzimas BamHI y PstI liberando un inserto que contenía desde el nucleótido 10 al 1248 del gen N más una pequeña secuencia que provenía de la adición de poliC al vector de clonado pBR322. Este fragmento se clonó en el vector pBS SK⁺ (Bluescript de Stratagene). Luego de transformar *E.coli* DH5 α , los plásmidos recombinantes se seleccionaron por pérdida de la actividad de β -galactosidasa, en medio con ampicilina, XGal e IPTG. Dichos recombinantes, denominados pBS1248 se cortaron con las enzimas StuI (dentro del ORF del gen N) y ClaI (dentro del polilinker del vector), purificándose un fragmento de 3,3 kpb en el que el vector pBS lleva un fragmento del ORF de N desde el nucleótido 10 al 408. (el resto del ORF/409-1248 se eluyó con el fin de preparar sondas radiactivas).

Paralelamente a este proceso, el clon 82.242 se cortó con las enzimas StuI (dentro del ORF de N y PstI (dentro del sitio de clonado en pBR322) purificándose un fragmento de 1672 pb que se cortó con la enzima TaqI. Los dos fragmentos producidos (uno correspondiente al ORF de N: nucleótidos 409 al 1772 y otro con la región intergénica y parte del ORF de GP: 1773-2080) se ligaron al recombinante pBS1248/StuI-ClaI de tal modo que sólo el correspondiente al ORF N pudiera insertarse por compatibilidad de los extremos.

Figura 4.1. Esquema de la reconstrucción del gen N del virus LCM.

Los clones 39.50, 81.268 y 82.242 (Romanowski y Bishop, 1985) son derivados de cDNA insertado en el sitio PstI del vector pBR322. Una descripción detallada del procedimiento se encuentra en el texto.

REFERENCIAS: B: BamHI; C: ClaI; Ps: PstI; Pv: PvuII; S: SmaI; St: StuI; X: XhoI; Amp^r: gen de β -lactamasa, que otorga resistencia a la ampicilina.

Con esta mezcla de ligación se transformaron *E. coli* DH5 α y se seleccionaron aquellas que presentaban el gen N por hibridación de colonias usando como sonda el fragmento correspondiente a los nucleótidos 409-1248 previamente purificado. Diez clones de señal positiva se amplificaron y se analizaron los patrones de restricción de sus plásmidos usando las enzimas HindIII y HinfI (que permiten determinar la presencia de todos los fragmentos de los que se partió) y de la combinación BamHI-XhoI, que libera un fragmento de 1762 pb correspondiente al gen N completo incluyendo regiones 3' y 5' no codificantes.

4.1.2. Construcción del gen N del virus Junín

A partir de los clones pJUN63 y pJUN42 se reconstruyó el gen completo de la proteína de la nucleocápside de acuerdo a la estrategia que se muestra en la fig 4.2.

A partir del clon pJUN63 se purificó un fragmento de restricción BamHI-PstI de 860 pb, el cual se clonó en el vector pBS. Con otra digestión enzimática, también a partir de pJUN63 se aisló otro fragmento, de 58 pb, que estaba delimitado por los sitios PstI-HinfI. Este último fragmento se purificó por separado debido a que, en la zona de superposición de ambos clones (pJUN63 y pJUN42) el único sitio común era el HinfI y pJUN63 presenta cuatro sitios HinfI que hacen imposible obtener un fragmento completo BamHI-HinfI (ver esquema de los clones en el capítulo anterior).

A partir del clon pJUN42 se purificó un fragmento HinfI-EcoRI (este último sitio provenía del vector de clonado pUC18) que se ligó, en una misma reacción al recombinante pBS63 cortado con las enzimas PstI (del inserto del gen N) y EcoRI (del vector pBS). Se transformaron bacterias DH5 α y por hibridación de colonias se detectaron varios clones que poseían ambos fragmentos, dando el recombinante pBNJUN. Estos recombinantes, analizados por mapeo de restricción demostraron tener el marco de lectura abierto del gen N completo, además la región no codificantes 3' y la región intergénica completa (a diferencia del rearmado de LCM que no contiene completa la región intergénica).

Figura 4.2. Esquema de la reconstrucción del gen N del virus Junín.

Se usaron los clones pJUN63 (clonado en pUC9) y pJUN42 (clonado en pUC18) ya descritos en el capítulo previo (véase la figura 3.3)

REFERENCIAS: B: BamHI; E: EcoRI; Hf: HinfI; P: PstI.

Figura 4.3. Mapa de los vectores de expresión usados.

A la izquierda se muestra el vector recombinante pKG4NJUN.

El gen N de los virus Junín (NJUN) o LCM se clonó en los sitios BamHI-XhoI del vector pKG4, usándose para transfecciones transientes y estables.

La expresión del gen clonado está dirigida por las secuencia promotor de los genes tempranos del virus SV40 y el *enhancer*, incluyendo el origen de replicación del virus. Por detrás del ORF del gen clonado se encuentran las secuencias del intrón del antígeno t del virus SV40 y la señal de poliadenilación. El gen bacteriano de la neomicina fosfotransferasa (Neo^r) se expresa en células eucariotas bajo el control del promotor del gen de la timidina quinasa del virus herpes (TK) y permite la selección en presencia de G-418. El plásmido contiene el gen de resistencia a Ampicilina (Amp^r) y el origen de replicación (Ori) del plásmido pBR322.

A la derecha se esquematiza el vector recombinante p91023-NJUN.

Este plásmido permite tanto la expresión transiente en la mayoría de las líneas celulares así como el establecimiento de clones estables en líneas celulares defectivas en el gen de la dihidrofolato reductasa.

El gen N del virus Junín se clonó en el sitio EcoRI del vector p91023 (Kaufman y Sharp, 1982; Kaufman, 1986).

Los elementos importantes para la expresión son : el origen de replicación y la secuencia *enhancer* del virus SV40 (SVOE), secuencias de adenovirus que incluyen el promotor mayor tardío de Ad2 (MLP), un *leader* tripartito con secuencias donadoras de splicing (TPL), secuencias aceptoras de splicing (SAS) y los genes VA_I y VA_{II} (VA) que activan la traducción de los mRNA que contienen el *leader* tripartito. El gen de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), capaz de ser amplificado junto con secuencias adyacentes en presencia de metotrexato se encuentra inmediatamente después del gen clonado presentando el sitio de poliadenilación (PA) del antígeno t del virus SV40.

Por otra parte, el plásmido contiene el gen de resistencia a tetraciclina (Tetr) y el origen de replicación (Ori) del plásmido pBR322 con las llamadas "secuencias venenosas" delecionadas (ΔPS).

4.2. Expresión transiente en líneas celulares

Los experimentos de transfección se llevaron a cabo de acuerdo al esquema que se muestra en la figura 2.1.

En ellos se calculó la eficiencia de transfección como el porcentaje de células que expresaban la proteína N (detectada por inmunofluorescencia indirecta) a 48 o 72 horas postransfección. Este resultado fue variable dependiendo de la línea celular usada y el método elegido. Sin embargo, en todos los casos analizados, el método de transfección por precipitación con fosfato de calcio permitió obtener mejores resultados en células BHK-21 (5-15 % de eficiencia), en tanto que el método de DEAE-dextrano fue el más efectivo en las líneas VERO 76 y CV-1 (5-20 % con un máximo de 80% en un experimento llevado a cabo con CV-1).

Para las células HeLa se utilizó siempre el método de transfección mediado por lípidos con eficiencias del orden del 10% en tres experimentos, en tanto que para la transfección de las células Cos-1 se usó con el mismo resultado el método de DEAE-dextrano o la lipofección.

Es importante señalar que la dispersión de los resultados de las eficiencias fue grande, aún entre experimentos estandarizados realizados en las mismas condiciones. Esta variabilidad es un aspecto común en esta metodología debido a que existen numerosos aspectos experimentales no descriptos ni estudiados y, por ello, difíciles de controlar, tales como el estado fisiológico de la línea celular, el número de pasajes posteriores al descongelamiento del stock, etc. (Ausubel *et al.*, 1989).

4.3. Nivel de expresión del gen N

Los niveles de expresión, estimados a partir de la intensidad de fluorescencia relativa (Portela *et al.*, 1985), fueron variables dentro de un mismo experimento entre células diferentes. Esto parece reflejar un efecto de "dosis génica" debido a la entrada de un distinto número de moléculas de plásmido recombinante en cada célula.

En general, los niveles de expresión de la proteína N en las células BHK-21, VERO, HeLa o CV-1 fueron de la misma magnitud que el estimado en células infectadas (considerando las mismas condiciones de pegado de los anticuerpos usados en la detección). Esta observación es importante con el fin de llegar a conclusiones que impliquen el comportamiento de la proteína N en células infectadas.

En los experimentos llevados a cabo con la línea Cos-1 los niveles de expresión fueron más altos y no comparables a los anteriores, debido a la inducción de la replicación del plásmido recombinante (como elemento extracromosómico) por el antígeno T del virus SV40, que esta línea expresa de manera constitutiva (Brady *et al.*, 1984). Por otra parte, no es una línea celular estudiada en cuanto a los efectos de la infección con arenavirus.

4.4. Caracterización del producto expresado

La identidad del producto de expresión del gen N fue analizada mediante anticuerpos monoclonales contra la proteína N de los virus Junín (Sánchez *et al.*, 1989) y LCM (Buchmeier *et al.*, 1981).

Con el fin de confirmar la identidad de la proteína expresada, los anticuerpos contra la proteína N del virus Junín se usaron para inmunoprecipitar la proteína recombinante de extractos citoplasmáticos de células BHK-21 previamente incubadas con metionina- $[^{35}\text{S}]$ o revelar su presencia por ensayos de *Western blot* en lisados de BHK-21 o CV-1.

Utilizando ambas técnicas (fig. 4.4a. y 4.4.b.) se detectó en las células transfectadas con el plásmido pKG4NJUN un polipéptido de 63 kDa, inmunológicamente indistinguible (usando los anticuerpos monoclonales SA03-BG12, QB06-AE05 y NA05-AG12 obtenidos por Sánchez *et al.*, 1989) de aquel que corresponde a la proteína N en células infectadas con el virus Junín. Este polipéptido está ausente de lisados celulares transfectados con el vector de expresión pKG4 sin el inserto de cDNA del gen N o con el mismo en la orientación opuesta a la codificante.

Por otra parte, el peso molecular de la proteína producida por expresión transiente a partir del gen clonado coincide con el peso molecular predicho a partir de la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia del gen (63 kDa), con los resultados publicados para viriones por Grau *et al.* (1981) y las proteínas virales sintetizadas en células BHK-21 infectadas estudiadas por Rustici (1985) y De Mitri y Martínez Segovia (1985).

Figura 4.4a. Análisis de la expresión de la proteína N.

Inmunoprecipitación de proteínas marcadas con L[³⁵S]Metionina.

Las células BHK-21 se transfectaron de manera transiente o infectaron con virus Junín. Las proteínas se marcaron *in vivo* por incubación durante 24 horas con L[³⁵S]Met a 48 horas postransfección o 72 horas post infección. Luego las células se lisaron y las proteínas se precipitaron con una mezcla de anticuerpos monoclonales anti-N Junín, tal como se describe en materiales y métodos. Los precipitados se analizaron por SDS-PAGE 14%.

- A. Células transfectadas con el vector pKG4.
- B. Células infectadas con el virus Junín.
- C. Células transfectadas con el recombinante pKG4.NJUN

Figura 4.4b. Análisis de la expresión de la proteína N.
Western blot de proteínas celulares.

Células BHK-21 o CV-1 se transfectaron de manera transiente con el recombinante pKG4.NJUN o se infectaron con virus. A las 48 horas post transfección o 72 horas post infección las células se lisaron con buffer de muestra conteniendo SDS y B-mercaptoetanol, se sometieron a SDS-PAGE 12% y se transfirieron a nitrocelulosa. La proteína N se reveló por medio de anticuerpos monoclonales anti-N Junín y proteína A conjugada con oro coloidal, tal como se describe en materiales y métodos.

1. BHK-21 infectadas con el virus Junín.
2. BHK-21 transfectadas con el recombinante pKG4.NJUN.
3. CV-1 transfectadas con el recombinante pKG4.NJUN.
4. BHK-21 transfectadas con el plásmido pKG4.

Tanto en 4.4.a como en 4.4.b la posición de la proteína N se indica con una flecha. Los marcadores de peso molecular se indican al costado (en kDa).

Figura 4.5. Northern blot de células transfectadas.

El RNA extraído de células transfectadas de manera transiente con pKG4.NJUN, corrido en un gel de agarosa-formaldehído y transferido a Gene-Screen fue hibridado con sondas de RNA radiactivas de polaridad viral (genómica) derivadas de la transcripción *in vitro* del gen N clonado.

Se indica la posición del transcripto derivado del cDNA clonado en el vector pKG4.NJUN (mRNA N), del DNA plasmídico que dio origen al transcripto (vector) y de los rRNAs 18 S y 28 S.

- a. BHK-21 transfectadas con el plásmido pKG4.
- b. BHK-21 transfectadas con el recombinante pKG4.NJUN.
- c. VERO transfectadas con el recombinante pKG4.NJUN.

4.5. Análisis del producto de transcripción

La transcripción de mRNA a partir del gen clonado se analizó por *Northern blot* usando como sonda un RNA de polaridad viral transcripto *in vitro* a partir del gen N clonado. Este RNA, marcado con ^{32}P , detectó secuencias específicas de polaridad viral complementaria de un tamaño de 1,8 kb, tal como cabía esperar para el producto de la transcripción de longitud completa de la secuencia insertada en el vector pKG4 (fig. 4.5).

Además, se detectó una secuencia de mayor tamaño que hibridaba con la misma sonda. Esta se atribuye al plásmido recombinante que, como elemento extracromosómico, copurifica con el RNA cuando se usa el método de Chomczynski y Sacchi (1987).

4.6. Patrón de expresión del gen N

El análisis de la distribución de la inmunofluorescencia en las células fijadas, mostró a la proteína N como exclusivamente citoplasmática.

Tal como se observa en la fig. 4.6, el patrón de distribución en las células transfectadas con pKG4NJUN (p91023NJUN da el mismo resultado) es similar al que se observa en células infectadas: la fluorescencia es citoplasmática difusa o concentrada en gránulos, en su mayoría perinucleares.

Tanto las células BHK-21 como las CV-1 transfectadas con la construcción que lleva el gen N de LCM, que se muestran en la fig 4.7 muestran un patrón similar al descrito para N de Junín, asociando la acumulación de la proteína N a gránulos citoplasmáticos visibles con óptica de contraste de fases, coincidiendo en este aspecto con las descripciones publicadas sobre células infectadas (Bruno Lobo *et al.*, 1968; Sánchez *et al.*, 1989).

En algunos casos, se observaron variaciones en el patrón de expresión dentro de cada línea celular en un mismo experimento. En particular, las células BHK-21 o CV-1, que expresaban el gen N recombinante, mostraron un patrón de inmunofluorescencia desde difuso hasta granular extremadamente concentrado en pocos gránulos perinucleares (fig 4.8).

Resultados semejantes se obtuvieron también con las líneas VERO, HeLa y Cos-1, tanto para la expresión del gen N de virus Junín como de LCM.

Figura 4.6. Análisis por inmunofluorescencia indirecta de la expresión del gen N de Junín.

A las 48 horas postransfección o 72 horas postinfección, las células, se fijaron con formaldehído y permeabilizaron con acetona, se trataron luego con una mezcla de anticuerpos monoclonales anti-N Junín y finalmente se revelaron con IgG de cabra anti-ratón conjugada con FITC.

Las microfotografías de la izquierda muestran la localización del producto de expresión. A la derecha se muestra el mismo campo visto con óptica de contraste de fases. El aumento es en todos los casos 640X.

A-B. Células CV-1 infectadas con virus Junín.

C-D. Células CV-1 transfectadas con el recombinante pKG4.NJUN.

E-F. Células BHK-21 transfectadas con el recombinante pKG4.NJUN.

El control negativo de estos experimentos es interno y está dado por aquellas células que no expresan la proteína N.

Figura 4.7. Análisis por inmunofluorescencia indirecta de la expresión del gen N de LCM.

A las 48 horas postransfección o 72 horas postinfección, las células se fijaron con formaldehído y permeabilizaron con acetona, se trataron luego con un anticuerpo policlonal humano anti-N LCM y finalmente se revelaron con IgG de cabra anti-humano conjugada con FITC.

Las microfotografías de la izquierda muestran la localización del producto de expresión. A la derecha se muestra el mismo campo visto con óptica de contraste de fases. El aumento es en todos los casos 640X.

A-B. Células CV-1 infectadas con virus LCM (WE).

C-D. Células CV-1 transfectadas con el recombinante pKG4.NLCM.

E-F. Células BHK-21 transfectadas con el recombinante pKG4.NLCM.

El control negativo de estos experimentos es interno y está dado por aquellas células que no expresan la proteína N.

Figura 4.8. Patrón de expresión de la proteína N del virus Junín en células transfectadas de manera transiente.

Las células se trataron tal como se describe en la figura 4.6.

Las microfotografías de la izquierda muestran la localización del producto de expresión. A la derecha y de manera correspondiente se muestra el mismo campo visto con óptica de contraste de fases. El aumento es en todos los casos 640X.

Las fotografías A-D corresponden a células CV-1, en tanto que las E-H son de BHK-21, en todos los casos analizadas a las 48 horas después de ser transfectadas de manera transiente con pKG4.NJUN (las fotografías mostradas aquí no provienen de un mismo experimento, pero es común ver casi todos los patrones descriptos en un mismo experimento de transfección).

En A-B se muestra un patrón de expresión difuso para la expresión de N. Este patrón se va concentrando gradualmente en gránulos citoplasmáticos (C-D). En las microfotografías E-F la proteína N se encuentra en gránulos citoplasmáticos muy concentrados que pueden verse con óptica de contraste de fases como cuerpos densos intracelulares. Como caso extremo, en G-H el patrón de expresión es de pocos gránulos fuertemente fluorescentes concentrados en la región perinuclear y también visibles con óptica de contraste de fases.

El control negativo de estos experimentos es interno, dado por las células que no expresan N.

Experimentos en los que la proteína N se detectó usando un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa y contrastando las preparaciones con hematoxilina, se observó el carácter basófilo de los gránulos asociados a la proteína N, tal como se describió para las infecciones con el virus Junín (Bruno Lobo *et al.*, 1968; Damonte y Weissembacher, 1983). Por otra parte, se puso de manifiesto la distribución concentrada en zonas restringidas en células en división o próximas a la mitosis (resultados no mostrados).

4.7. DISCUSION

Las células BHK-21 y VERO (y en menor medida CV-1, aunque con el mismo comportamiento que las células VERO) han sido ampliamente usadas en el estudio de la biología de los arenavirus. Por ello, se eligieron para los estudios de expresión del gen N aislado, descritos en este capítulo. Siendo los niveles de expresión de N de Junín y LCM similares en células transfectadas e infectadas, podríamos esperar que la proteína recombinante se comporte de una manera similar a la que se observa en células infectadas. Estos resultados muestran que la localización del polipéptido es citoplasmática para ambos virus.

Sin embargo, Zeller *et al.* (1986, 1988) demostraron que al menos un epítipo de la proteína N de LCM se puede detectar en la superficie del virión y de células infectadas. Este resultado no ha podido ser confirmado en células transfectadas con pKG4NLCM en este trabajo, ni por otros investigadores en células infectadas. Tampoco se pudo determinar la presencia en superficie de la proteína N de virus Junín, aunque esto no se ha reportado hasta la fecha en células infectadas. El argumento que sostiene la posibilidad del anclaje de N en la membrana se basa en la presencia de una zona hidrofóbica en dicha proteína de LCM, zona que no se observa tan claramente en el virus Junín.

Por otra parte, Young *et al.* (1987) observaron la presencia de la proteína N del virus Pichindé en el núcleo de la célula infectada asociada con un polipéptido de 27 kDa, inmunorreactivo con anticuerpos monoclonales anti N. Este tipo de polipéptido se ha descrito para el virus Junín (Sánchez *et al.*, 1989), aunque no se lo ha definido aún como producto de degradación o procesamiento, ni se identificó la proteína N como nuclear en ninguna de las fases de la infección en cultivos celulares. Sin embargo, se han detectado antígenos virales en el núcleo de células

de páncreas y neuronas durante infecciones en animales (Garay, 1975; Maiztegui et al., 1975).

Tal como se describió en el capítulo 3, los arenavirus tienen una secuencia muy conservada en la zona carboxilo terminal formada por al menos cuatro residuos de aminoácidos básicos semejantes a las secuencias de transporte nuclear.

La asociación de la proteína N en gránulos basófilos se puede relacionar con las propiedades fisicoquímicas del polipéptido N, que le permitiría interaccionar con RNAs citoplasmáticos y formar complejos de ribonucleoproteínas. Esta, a su vez, coincidiría con el patrón granular y espiculado descrito en células infectadas (Bruno Lobo et al., 1968; Damonte y Weissenbacher, 1983; Sánchez et al., 1989). Esta aparición de gránulos citoplasmáticos asociados a la proteína N sugeriría una relación entre su síntesis y la aparición del efecto citopático en las células infectadas, lo que se discutirá en el capítulo siguiente.

La asociación de RNP en gránulos citoplasmáticos, sumado a los cambios que se observan en diferentes células y en diferentes estados del ciclo celular, muestran semejanzas con un grupo nuevo de partículas ribonucleoproteicas denominadas *vaults* (Miquel et al., 1988). Estas partículas tienen un comportamiento semejante en eucariotas inferiores y superiores, son de gran tamaño y se las asocia con formaciones semejantes a virus (Kedersha y Rome, 1990). También se las relaciona con el citoesqueleto, tal como podría ser el caso de la proteína N, según se discutirá en el capítulo siguiente.

CONCLUSIONES

1. La mitad 3' del RNA viral tiene un gen que codifica la proteína de la nucleocápside viral.
2. El producto de expresión del gen es un polipéptido de 63 kDa, tal como se deduce de la secuencia de aminoácidos del producto primario del gen clonado.
3. La proteína así expresada, reproduce el patrón de localización de la proteína durante la infección viral. Este hecho sugiere que el mecanismo de ubicación celular es propio de la estructura primaria o tridimensional de la proteína N.

4. La proteína expresada está asociada a gránulos basófilos (RNP) de localización citoplasmática y de patrón de distribución variable dentro de cada línea celular.

5. EFECTOS DE LA EXPRESION DE N EN CELULAS EN CULTIVO

De acuerdo a lo descrito en el capítulo 4 las líneas celulares se transfectaron de manera transiente. Por otra parte, se realizaron transfecciones estables con el propósito de estudiar el efecto posible de la proteína N en monocapas que la expresan constitutivamente.

Para los experimentos de transfección estable se usó el vector pKG4, que tiene el gen de neomicina fosfotransferasa y permite la selección de clones por medio del antibiótico G-418. En varios experimentos realizados se aislaron 48 clones de los cuales un 10% (en promedio) mostró expresión de N detectada por inmunofluorescencia indirecta.

5.1. Efecto de la expresión de N en células transfectadas

Las transfecciones transientes se realizaron en células BHK-21, CV-1, HeLa y VERO, en tanto que la selección de transfectantes estables se llevó a cabo en BHK-21 y VERO.

Las transfecciones transientes mostraron un patrón de expresión que se describió en el capítulo anterior. En las diferentes líneas, fue notorio el cambio de los efectos que se atribuyen a dicha expresión. Mientras las células BHK-21 no mostraban cambios al microscopio óptico, al cabo de 48 a 72 horas post transfección, las células CV-1, HeLa y VERO evidenciaron un cambio análogo al efecto citopático producido durante la infección viral (Bruno Lobo *et al.*, 1968; Tkaczewski y Boxaca, 1970). Este resultado se asemeja a la acción citopática de los arenavirus que es marcada en dichas líneas celulares y no aparente en BHK-21 (aunque no significa ausencia de modificaciones a nivel bioquímico).

Como se muestra en la figura 5.1, 5.2 y 5.3 la expresión de la proteína N va acompañada de cambios en el citoplasma celular y en la morfología general. Este proceso comienza con la acumulación de gránulos citoplasmáticos (efecto citopático de tipo B, según Pereira, 1961) con inmunorreacción positiva para la proteína N y patrón de distribución como el anteriormente descrito; al cabo de un tiempo las células comienzan a llenarse de vesículas o vacuolas, el citoplasma se hace más oscuro y el núcleo se concentra, observándose a veces células multinucleadas, en un proceso semejante al de lisis celular. La fig. 5.2 muestra los extremos del proceso en una célula CV-1 que no expresa N y su contraparte que la expresa. En esta se ve un proceso semejante a la lisis inducida por la infección viral.

Figura 5.1. Expresión de la proteína N del virus Junín en células CV-1 transfectadas.

A. Inmunofluorescencia indirecta de una célula CV-1 a las 72 horas de ser transfectada con pKG4.NJUN. Aumento 640X.

B. Microfotografía con óptica de contraste de fases de un cultivo de células CV-1 transfectadas con pKG4.NJUN y fijadas. Aumento 200X. El recuadro indica el campo visto en A. La célula, que expresa la proteína N, tiene un aspecto granuloso y es más oscura que el resto de la monocapa, mostrando una morfología semejante a la que se describe para el efecto citopático en las células infectadas con el virus.

Figura 5.2. Efectos de la expresión del gen N del virus Junín en células CV-1.

Los dos paneles de la izquierda (A y C) muestran por contraste de fases y fluorescencia una célula que no expresa la proteína N. Las microfotografías B y D muestran una célula que expresa N a las 72 horas postransfección. En esta última se observa un marcado efecto citopático con cambio en la morfología celular, aparición de gránulos y vesículas citoplasmáticas y un incipiente estado de lisis que incluye cambios en la morfología nuclear.

Ambas células, vistas con un aumento de 640X provienen del mismo experimento de transfección (usando el plásmido pKG4.NJUN).

Figura 5.3. Inmunofluorescencia de células BHK-21 transfectadas de manera estable con el gen N del virus Junín.

La detección de la proteína N en clones de células BHK-21 que expresan de manera constitutiva el gen N del virus Junín se realizó tal como se describe en la figura 4.6. El clon que se muestra tiene cuatro pasajes luego de su aislamiento. Las microfotografías A y B representan el mismo campo observado por epifluorescencia (A) y óptica de contraste de fases (B). El aumento es 400X. Como se ve, todas las células muestran expresión de la proteína N, la cual se localiza en todo el citoplasma. Las células se ven granulosas y en algunos casos se observan multinucleadas.

Figura 5.4. Microfotografías *in vivo* de cultivos transfectados de manera estable que expresan la proteína N.

Los clones que se muestran corresponden a células BHK-21 transfectadas de manera estable; tienen cuatro pasajes luego de su selección en G-418 y posterior aislamiento. Las microfotografías fueron tomadas con óptica de contraste de fases sobre los cultivos vivos usando un microscopio invertido. El aumento se indica entre paréntesis.

Se puede observar los notables cambios de morfología asociados a la expresión de la proteína N.

A. Clon de células BHK-21 transfectadas con el vector pKG4 y seleccionado por su resistencia al antibiótico G-418 (200X).

B. Células BHK-21 transfectadas con pKG4.NJUN, pero que no expresan la proteína N (100X)

C. Clon de células BHK-21 transfectadas con pKG4.NJUN que expresan la proteína N del virus Junín. Se puede observar que las células se hacen más extendidas, con morfología heterogénea, se llenan de granulaciones y presentan polycariosis (200X).

D. Clon de células BHK-21 transfectadas con pKG4.NLCM que expresan la proteína N del virus LCM. Presentan los mismos cambios descritos para las transfectadas con N de Junín (200X).

Los procesos de cambio morfológico en las células transfectadas, de manera semejante a las infectadas, podrían incluir cambios en la distribución de los componentes del citoesqueleto.

Una vez repicados por separado y amplificados hasta monocapa, aquellos clones con expresión constitutiva de N, ya sea de Junín o LCM, mostraron un marcado cambio en la morfología celular. Los clones derivados de BHK-21, a diferencia de los resultados de las transfecciones transientes, presentaban efecto citopático en toda la monocapa (fig. 5.4c y 5.4d). Dicho efecto se caracterizó por un mayor tamaño de las células, que se hacían más chatas y extendidas, policariosis, vacuolización y granulación citoplasmática. Al cabo de unos 5-7 pasajes, la línea celular moría. Por el contrario, las líneas resistentes a G-418 que no expresaban N no mostraban dichos cambios morfológicos (fig 5.4a y 5.4b).

El efecto citopático persistía en las células que expresaban N, aún cuando en algunos experimentos se eliminó el antibiótico en la etapa de aislamiento y amplificación de los clones, indicando que el proceso de selección no sería un inductor sinérgico del efecto citopático.

Por otra parte, las células VERO, que presentaban un marcado efecto citopático en las transfecciones transientes, no fueron útiles para conseguir clones estables, supuestamente por el efecto citopático más marcado inducido por la proteína N en las etapas tempranas de la expresión.

5.2. Efecto de la proteína N en la replicación viral

Para poder analizar el efecto de la expresión de la proteína N en la replicación y crecimiento viral se aprovecharon los clones estables obtenidos en los experimentos descritos anteriormente durante los primeros pasajes. Estos experimentos se llevaron a cabo con la idea de determinar si la proteína N, que tiene capacidad de formar nucleocápsides, es responsable de algún mecanismo de exclusión de la superinfección por virus homólogos o heterólogos o bien permite la producción de virus.

Las infecciones se realizaron en los clones que expresaban N del virus Junín, no la expresaban (control negativo del experimento) o no transfectadas, a dos multiplicidades de infección y con ambos virus, Junín y LCM. Los resultados expresados en la figura 5.5 muestran que el virus puede replicarse en presencia de N endógena sin mediar mecanismos de exclusión. Estos resultados se complementarán en el próximo capítulo

Figura 5.5. Efecto de la expresión de la proteína N sobre la producción de virus.

Los clones estables que expresaban la proteína N de los virus LCM y Junín fueron infectados con virus Junín a multiplicidades de infección de 0,1 y 0,01 ufp/célula de acuerdo a los procedimientos descritos en materiales y métodos. A los 4 días postinfección el medio sobrenadante de cada cultivo se tituló para determinar la formación de viriones.

BHK: infección realizada en células BHK-21 no transfectadas (control). mdi=0,1.

BJ1: infección realizada en clones de BHK-21 que expresan la proteína N del virus Junín a mdi=0,1.

BJ2: ídem que BJ1 a mdi=0,01.

BL1: infección heteróloga realizada en clones de BHK-21 que expresan la proteína N del virus LCM a mdi=0,1.

BL2: ídem que BL1 a mdi=0,01.

acerca del posible rol de la proteína N en los procesos de transcripción y replicación viral.

DISCUSION

El efecto citopático (CPE) fue definido por Enders (1954) como un cambio morfológico o bioquímico que ocurre en las células infectadas con virus y que dependiendo de los casos puede llevar a la muerte celular. De acuerdo a la clasificación que el mismo Enders propuso, dicho efecto puede ser: 1. degeneración celular, 2. formación de cuerpos de inclusión y degeneración celular y, 3. formación de células multinucleadas por fusión, con degeneración y con o sin presencia de cuerpos de inclusión. De un modo más amplio podemos decir que el efecto citopático es un conjunto de mecanismos de cambio celular, ya sea morfológico, fisiológico o molecular que no es posible de generalizar (Wagner, 1984).

En el caso particular de los arenavirus el efecto citopático puede definirse a nivel celular por cambios en la morfología o en la aparición de nuevas estructuras subcelulares (Bruno Lobo *et al.*, 1968; Dalton *et al.*, 1968; Murphy *et al.*, 1970; Tkaczewski y Boxaca, 1970; Tkaczewski y Correa, 1972; Mannweiler y Lehmannn-Grube, 1973; Murphy *et al.*, 1973; Maiztegui *et al.*, 1975; Murphy y Whitfield, 1975), por cambios en la síntesis de proteínas (López y Franze-Fernández, 1985; López, 1986), en los patrones de transcripción (Klavinskis y Oldstone, 1989) o en la permeabilidad de la membrana y, por consiguiente, en los mecanismos de transporte de iones (Rey *et al.*, 1988; Rey, 1990).

Siendo que los arenavirus infectan un variado número de células, el efecto en cada una de ellas no es igual, produciendo un marcado efecto citopático en líneas como CV-1, VERO o HeLa, que finalmente conducen a la lisis celular o bien de modo muy atenuado o no produciendo ninguno en líneas como BHK-21 o células L de ratón(*).

Los resultados que se muestran en este capítulo llevan a suponer que dicho efecto es mediado, al menos en parte, por la proteína N, cuya expresión reproduce, no sólo los patrones de distribución ya descriptos, sino también el efecto citopático que el virus induce en células capaces de ser lisadas. En expresiones transientes, y teniendo en cuenta que la cantidad de proteína producida intracelularmente es equivalente a la

(*) Garcin y Kolalofski (1990) describieron un efecto citopático generalizado en células BHK-21 luego de una infección a altas mdi con el virus Tacaribe, aunque es un resultado muy dudoso.

producida durante la infección, la aparición del efecto citopático cumple lo esperado para las infecciones: CV-1, HeLa y VERO muestran efecto citopático, mientras que en BHK-21 el efecto es imperceptible.

Sin embargo en las transfecciones estables el efecto citopático aparece en las células BHK-21 ya sea con la expresión de N de Junín o de LCM. Este efecto es difícil de explicar debido a que los arnavirus producen pocas modificaciones visibles. Estos cambios inducidos por la expresión de N podrían deberse a que en las células infectadas existen mecanismos que disminuyen el número de moléculas de proteínas libres, capaces de ligarse a otros RNAs que no sean los virales. Otra posible explicación sería que, siendo la proteína N un polipéptido capaz de ser fosforilado en la célula infectada (hecho aún no comprobado en el virus Junín, pero sí en LCM) el estado de N varíe la capacidad de producir efecto citopático en distintas líneas celulares. De todos modos, si bien el efecto citopático es evidente en las células transfectadas y no lo es en las células infectadas, hay indicios para suponer que existen similitudes.

Observaciones preliminares, realizadas con técnicas de inmunomicroscopía electrónica, de células BHK-21 transfectadas de manera estable con el gen N muestran similitudes con las células L infectadas con LCM (Mannweiler y Lehmann-Grube, 1973) y con células pancreáticas de ratones infectados con el virus Junín (Maiztegui *et al.*, 1975): las células BHK-21 que expresan la proteína N presentan cuerpos de inclusión multilamelares, característicos del efecto citopático producido por los arnavirus en las condiciones mencionadas (datos no mostrados).

Por otra parte, la descripción hecha para la mayoría de las líneas celulares de un efecto de retracción y redondeado de las células, que se cumple en las infecciones con arnavirus y en las transfecciones realizadas implicarían un efecto en la estructura del citoesqueleto.

Estudios realizados en células infectadas con el frog virus-3 (Murti y Goorha, 1983; 1990) mostraron que el desensamblado del citoesqueleto contribuye al ensamblado de las nucleocápsides virales (el cual ocurre en zonas delimitadas de la célula en las que hay altos niveles de filamentos intermedios) y a la brotación del virus en zonas donde la actina se proyecta hacia la superficie celular. Al respecto, se ha comunicado que la actina se encuentra en viriones de Junín (Pasian *et al.*, 1983), aunque no se sabe si en asociación con algún componente del virión o como consecuencia del proceso de brotación, que arrastra citoplasma adyacente a la membrana plasmática.

En términos generales, es probable que pueda existir alguna interacción entre el citoesqueleto y componentes de la nucleocápside, de manera que permita el ensamblado y la migración intracelular de las estructuras a encapsidarse para la posterior brotación. En este sentido, se ha postulado en el virus de la estomatitis vesicular tanto a la proteína N (Chatterjee *et al.*, 1984) como a las proteínas M y NS como las proteínas responsables de este efecto (Simon *et al.*, 1990).

Por otra parte, se ha observado que componentes del citoesqueleto son factores necesarios para el proceso de transcripción y replicación de VSV (Hill *et al.*, 1981).

Además, en otros sistemas se han descrito proteínas de unión a RNA cuya función es transportar un RNA en particular a regiones celulares determinadas por interacción con el citoesqueleto (Yisraeli *et al.*, 1991).

Teniendo en cuenta estos ejemplos, las propiedades fisicoquímicas de la proteína N y el efecto observado sobre la morfología celular, N podría ser uno de los factores de desensamblado del citoesqueleto en las células infectadas por arenavirus y un factor de ensamblado y localización de la nucleocápside.

CONCLUSIONES

1. La expresión de la proteína N de los virus Junín y LCM en cultivos celulares trae aparejada la aparición de un efecto citopático semejante al efecto producido durante la infección viral.
2. La proteína N no participaría en mecanismos de exclusión por superinfección, permitiendo la replicación del virus.

6. TRANSCRIPCION DEL GEN N

6.1. Identificación de los transcriptos derivados del gen N

Los RNAs transcriptos a partir del gen N se analizaron en experimentos de *Northern blot* usando RNA total de células infectadas y sondas de polaridad definida (genómica o antigenómica).

El resultado de estos experimentos mostró que la forma genómica del gen N (de polaridad negativa) es un RNA de 3.5 kb, ya sea en viriones como en células infectadas. Por otra parte, la forma antigenómica (de polaridad positiva) se detecta como un RNA de 3,5 kb y otro de 1.8 kb en células infectadas y como una forma de 3,5 kb en el RNA de viriones (Figura 6.1). La forma de 3,5 kb corresponde al RNA S y la de 1,8 kb al mRNA del gen N.

Estos resultados sugieren la existencia de una región 3' viral de polaridad negativa, como en el resto de los arenavirus conocidos, que confirman los datos de secuencia mostrados en el capítulo 3. Además, existiría una región en la zona media del RNA S en la que la transcripción de las formas positivas y antigenómicas se interrumpe.

En la figura 6.1 puede observarse que las formas antigenómicas del RNA S se detecta en los viriones, lo que hace suponer que, en el virus Junín, las formas virales complementarias se encapsidan. La presencia de mRNA N en los viriones no puede asegurarse a partir de los datos mostrados.

En células VERO infectadas, analizando los RNAs celulares a 4-5 días post infección, la cantidad de la forma antigenómica que se detecta por Northern blots es mayor que la forma mRNA N. En cambio, en etapas más tempranas de la infección las proporciones de la forma antigenómica (RNA S) y subgenómica (mRNA N) es proxima a la equimolaridad.

Sin embargo, debido a la variación de las condiciones de transferencia, los experimentos de *Northern blot* no son aptos para determinaciones cuantitativas sino para estimaciones comparativas.

6.2. Análisis de la transcripción del gen N en presencia y ausencia de inhibidores de la síntesis proteica

Para iniciar el estudio de los mecanismos de transcripción y replicación del virus Junín se analizó la síntesis de mRNA derivado del gen N a lo largo del tiempo. Dichos estudios requirieron infecciones sincrónicas (a m.d.i. >50 ufp/célula) y métodos capaces de detectar bajos

Figura 6.1. Formas antigenómicas del RNA S del virus Junín.

Northern blot de RNAs de células infectadas con el virus Junín hibridadas con una sonda de RNA de polaridad genómica marcada con ^{32}P .

A- RNA de viriones altamente purificados

B- RNA de viriones purificados de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos.

C- RNA de células Vero infectadas (5 dpi). El asterisco marca el mRNA N.

D- RNA de células Vero no infectadas.

E- RNA de células Vero infectadas (2 dpi). La cantidad de RNA sembrado en el gel es mayor que la correspondiente a C.

Los rRNA se usaron como marcadores de tamaño internos, visualizándose por tinción con bromuro de etidio en el gel y observación en el filtro de nylon luego de la transferencia.

niveles de RNA en las etapas tempranas de la infección.

En estas condiciones se pudo detectar el mRNA de N a las 2-4 horas post infección (Figura 6.2a).

Estos datos sugieren que el mRNA N podría ser el primer producto de la transcripción del RNA S.

En presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas, no se observan cambios significativos en los niveles de transcripción del mRNA N, pero no se sintetizan las formas antigenómicas de longitud completa del RNA S (Figura 6.2b).

Estos resultados sugieren que se necesita un factor proteico que actúe como conmutador del mecanismo de transcripción al de replicación.

Si en presencia de inhibidores de síntesis proteica la replicasa es capaz de sintetizar mRNA N, pero no la forma antigenómica completa, podríamos pensar que se requiere la proteína N (o alguna proteína codificada fuera del RNA S) para que la transcripción proceda más allá de las secuencias de terminación para la síntesis del mRNA N.

La sobreexposición autorradiográfica de los *Northern blots* en las condiciones de inhibición mostró una pequeña cantidad de RNA S transcripto, el cual escaparía a la inhibición (que no es total) o bien podría ser una forma fuera del control de transcripción y replicación.

La manera en que ocurre el cambio de la transcripción a la replicación en los virus con genoma de RNA de polaridad negativa ha sido bien estudiada. En los paramixovirus, rhabdovirus, ortomixovirus y bunyavirus, que tienen los RNAs genómicos y antigenómicos encapsidados con la proteína NP (equivalente a la proteína N de arnavirus), la síntesis de dichas especies de RNA requiere la síntesis de proteínas por parte de la célula. Los mRNAs de NP, en cambio, son independientes de la misma (Raju y Kolakofski, 1986a; 1986b; Kolakofski y Raju, 1987; Bellocq *et al.*, 1987). Entonces, puede pensarse como modelo más sencillo que la concentración de proteína N no encapsidada es el factor que más afecta a la transcripción-replicación (Patterson *et al.*, 1987; Wertz *et al.*, 1987). Dentro de los arnavirus, el virus Tacaribe muestra el mismo efecto (Franze Fernández *et al.*, 1987).

6.3. Análisis de las señales de terminación

El mRNA N transcripto in vivo tiene un tamaño, estimado por

Figura 6.2. Síntesis de RNAs virales en células infectadas.

6.2.a. Detección por *Northern blot* de mRNA N en células Vero infectadas con el virus Junín. La flecha señala la posición del transcrito.

6.2.b. Transcripción del RNA S en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas. El panel de la izquierda muestra la síntesis de mRNA N en presencia de pactamicina de acuerdo a materiales y métodos. El panel de la derecha muestra la síntesis de mRNA N y RNA S en ausencia de dicho inhibidor.

En la parte superior de la figura se indican los tiempos post infección correspondientes en horas.

Ambos experimentos fueron realizados infectando las monocapas celulares con 50 ufp/célula, usando un stock concentrado de virus Junín. Experimentos previos analizando la incorporación de ³⁵S-Met en las células permitieron calcular la inhibición de la síntesis de proteínas en 99% luego de 30 minutos de inhibición y hasta 12 horas.

Northern blot, de unas 1,8 kb, aproximadamente la mitad de la forma de longitud completa del RNA S. Por otra parte, como hemos visto en el capítulo 3, es posible pensar que la región intergénica, que presenta una estructura secundaria potencial muy estable en forma de horquilla, actúe como terminador de la transcripción.

Con el fin de probar esa hipótesis se analizó el extremo 3' del mRNA N. Como primer paso se subclonó la región intergénica del RNA S del virus Junín en un vector (pGEM) que permite producir transcriptos *in vitro*. El inserto correspondía a un fragmento SacI-HindIII de un clon de cDNA que contenía la región intergénica, parte del gen N y parte del gen GPC (clon pJUN433, descrito en Ghiringhelli *et al.*, 1991; figura 6.3).

Los productos de transcripción de este plásmido (denominado pGEMHair) se usaron como sondas en ensayos de protección a RNasas sobre RNA total de células VERO o BHK-21 infectadas, no infectadas y RNA de viriones (Figura 6.3).

Los RNAs de polaridad genómica transcriptos *in vitro* con RNA polimerasa del fago T7 sobre el plásmido pGEMHair que contenía la secuencia de la región intergénica clonada, se hibridaron en condiciones estrictas con RNA celular total (con el fin de evitar la autohibridación de las sondas).

Se esperaba que la forma antigenómica del RNA S protegiera la sonda completa y que los mRNAs, de tener un punto de terminación antes de la secuencia del gen GPC mostraran formas parcialmente protegidas (de menor tamaño).

Los resultados de la hibridación y digestión con RNasa muestran que en las células VERO no infectadas (usadas como control negativo) no hay una protección de la sonda. De todos modos, después de exposiciones prolongadas se observaron fragmentos protegidos de tamaño menor y mayor que la longitud de la sonda, lo que hace suponer hibridaciones inespecíficas y digestiones incompletas.

Por el contrario, usando RNAs de células VERO o BHK-21 infectadas con el virus Junín se pueden observar dos formas protegidas distintas, una de un tamaño igual a la sonda completa (correspondería al RNA S antigenómico) y otra de un tamaño semejante a un transcripto que se extiende hasta completar la primera horquilla de la región intergénica (correspondería al mRNA N). Esta segunda forma no es homogénea pero presenta un tamaño mayoritario entre los nucleótidos 1815 y 1825 de la forma antigenómica, deducido por comparación con el marcador de tamaño.

Figura 6.3. Estrategia de análisis del extremo 3'.

Figura 6.4. Ensayo de protección a RNasas.

Autorradiografía mostrando la sonda protegida en el ensayo de protección a RNasas.

A. Control negativo: Células VERO no infectadas.

B. RNA de células VERO infectadas con virus Junín.

C y D. RNA de células BHK-21 infectadas con virus Junín.

E y F. RNA de viriones.

Las flechas señalan los fragmentos protegidos: la superior corresponde a la sonda completa (RNA S). La inferior corresponde a una forma protegida equivalente a un transcripto que termina en el primer *hairpin*.

Las calles A y B tienen una exposición de 24 horas, en tanto que las calles C a F tienen una exposición de 4 días.

Figura 6.5. Estructura del extremo 3' del mRNA N del virus Junín.

La posible estructura del extremo del mRNA N del virus Junín se muestra en la figura 6.5.

Los experimentos llevados a cabo con RNAs de viriones dieron como resultado una protección completa de la sonda (forma antígenómica encapsidada). (Figura 6.4).

Para determinar aproximadamente la longitud de los fragmentos protegidos se usaron como marcadores de tamaño el transcripto completo obtenido por acción de la RNA polimerasa del fago T7 sobre el plásmido pGEMHair cortado en el sitio de clonado con la enzima EcoRI, que lo lineariza. Por otra parte, este plásmido se cortó con la enzima SmaI que cliva la región intergénica, produciendo transcriptos que terminan luego de pasar la primera horquilla.

Estos resultados, obtenidos para el mRNA N del virus Junín, son coincidentes con los de Iapalucci *et al.* (1991) que usaron el ensayo de protección a nucleasa S1 en RNAs del virus Tacaribe. Ambos resultados dan una idea más clara de la región intergénica como terminador de la transcripción.

No se determinó si estos mRNAs son poliadenilados, aunque se ha asumido que no lo son, en base a que no presentan señales de poliadenilación, ni se ha detectado para otro arenavirus por separación en columnas de oligo dT-celulosa.

6.4. Análisis de los extremos 5'

Una segunda parte en el análisis de la transcripción del RNA S es el estudio del inicio de la transcripción, para establecer la estructura de los extremos 5' de los mRNAs N y GP y del RNA S (genómico y antígenómico).

Experimentos de extensión de primer llevados a cabo con RNA de viriones y células VERO o BHK infectadas permitieron detectar formas heterogéneas en el extremo 5', las que fueron clonadas para determinar su secuencia de acuerdo al diseño experimental esquematizado en la figura 6.6.

En las figuras 6.7 y 6.8 se muestran los resultados de las extensiones de primer realizadas sobre RNAs de los virus LCM y Junín y de células infectadas. En ambos, los extremos 5' de las formas intracelulares de RNA viral (ya sea la forma genómica o antígenómica) se observan bases supernumerarias de tamaño variable, extendidas más allá del tamaño que se

Hibridación con un "primer 1" específico y extensión con transcriptasa reversa

Degradación del RNA con álcali

Adición de poli C con desoxinucleotidil transferasa y dCTP

Hibridación de un primer conteniendo la secuencia poli G y dos sitios de restricción ClaI y EcoRI y el "primer 1"

PCR con Taq polimerasa. Amplificación de la secuencia extendida

Corte con EcoRI

Clonado

Secuenciación de varios clones con el objeto de analizar variaciones de la secuencia de los extremos

Figura 6.6. Estrategia para el análisis de los extremos 5'.

Figura 6.7. Ensayo de extensión de primer sobre RNAs del virus Junín.

Autorradiografía de los productos de extensión de *primers* en RNAs de células BHK-21 y VERO infectadas con virus Junín.

1. Extensión del extremo GPC en RNA de viriones.
2. Extensión del extremo GPC en BHK-21.
3. Extensión del extremo GPC en VERO.
4. Extensiones realizadas en células no infectadas.
5. Extensión del extremo N en RNA de viriones.
6. Extensión del extremo N en BHK-21.
7. Extensión del extremo N en células no infectadas.

Las secuencias por terminación de cadenas se usaron como marcadores de tamaño.

Figura 6.8. Ensayo de extensión de primer sobre RNAs del virus LCM.

Autorradiografía de los productos de extensión de *primers* en RNAs de células BHK-21 y VERO infectadas con virus LCM.

1. Extensión del extremo GPC en BHK-21.
2. Extensión del extremo GPC en VERO.
3. Extensión del extremo N en BHK-21.
4. Extensión del extremo GPC en RNA de viriones.
5. Extensión del extremo N en RNA de viriones.
6. Extensiones realizadas en células no infectadas.

Las secuencias por terminación de cadenas se usaron como marcadores de tamaño.

Figura 6.9. Determinación de la longitud del extendido del extremo 5' del RNA S genómico del virus Junín.

El RNA viral se extendió usando un *primer* complementario a la forma genómica en la región del gen GPC.

espera para una extensión total del primer usado.

Estas bases, sólo detectadas en las formas intracelulares y no en RNA de viriones, hacen suponer que podrían pertenecer a mRNAs intracelulares (o a formas intermediarias de replicación no encapsidadas).

Las bases no templadas no aparecían cuando las extensiones se realizaban sobre RNA de viriones. Teniendo en cuenta que esto podía deberse a una escasa cantidad de las formas antigenómicas, se realizaron sobreexposiciones de estos geles, pero no se encontraron RNAs de tamaño mayor al que podía esperarse a partir de la secuencia nucleotídica del cDNA clonado.

El tamaño exacto del producto de extensión del extremo 5' viral se verificó comparándolo con marcadores de tamaño provenientes de una secuenciación por terminación de cadenas (figura 6.9). Este resultado fue coincidente con la secuencia del cDNA clonado (Ghiringhelli *et al.*, 1991).

De manera más detallada se analizó el extremo 5' del RNA S antigenómico y del mRNA N, cuyas secuencias habían sido deducidas a partir de la secuencia del extremo 3' del RNA S viral (véase capítulo 3.2).

El clonado del extremo 5' de las formas antigenómicas se realizó amplificando el producto de extensión de primer por la reacción de polimerasa en cadena (PCR). El producto de esta amplificación fue un fragmento de unas 200-210 pb, tamaño que resulta de sumar a los 186 nucleótidos de la extensión unos 15-20 nucleótidos extendidos más allá del extremo 3' del producto de extensión de primer con desoxinucleotidil transferasa terminal. La figura 6.10 muestra los resultados de dicho procedimiento.

El fragmento amplificado se cortó con las enzimas EcoRI (presente en el extremo del primer que hibridaba con el poli-C) y HindIII (que reconoce un sitio de corte en el cDNA en el nucleótido 74 desde el extremo 5' del RNA antigenómico). Los productos fueron un fragmento de unos 100 pb y otro de 86 pb, lo que confirmó que la secuencia amplificada pertenecía al cDNA obtenido por extensión.

El fragmento original de 210 pb con extremos romos o el fragmento de EcoRI-HindIII se clonaron en el vector pUC9 cortado con las enzimas apropiadas. Un 10% de las colonias resultantes de la transformación dieron una señal positiva cuando fueron hibridadas con una sonda derivada de un fragmento del gen N. El patrón de restricción de los plásmidos mostró que la mayoría de los clones no presentaban rearrreglos de secuencia y mantenían los sitios de restricción antes mencionados.

Se secuenciaron diez clones, todos ellos derivados del fragmento de 210 pares de bases provenientes de RNA celular. Ocho mostraron que la secuencia del extremo 5' del RNA antigenómico es exactamente complementario a los primeros 19 nucleótidos conservados en los arenavirus, tal como se supuso en el capítulo 3. Otros clones mostraron bases no templadas adicionales en dicho extremo. La figura 6.10 muestra la secuencia obtenida.

La secuencia del extremo 5' del RNA S antigenómico del virus Junín muestra una secuencia entre los nucleótidos 4 y 11 complementaria al consenso UGUCACCU, que es la secuencia que Bruns *et al.* (1990) postularon como señal de reconocimiento para la replicasa de LCM. Esta secuencia, basada en la que describen Schubert *et al.* (1979) VSV, no se halla en ningún otro sitio que pueda dar origen a iniciaciones internas en el gen N del virus Junín, coincidentemente con lo observado en LCM.

La secuencia de los primeros 19 nucleótidos del RNA S genómico del virus Junín pudo deducirse a partir del secuenciamiento de la forma antigenómica del mismo ya que no había sido determinada por secuenciación directa del RNA S.

Un resultado constante en todas las extensiones de primer es la presencia de bandas de tamaño menor al cDNA completo como producto de terminaciones de la transcripción inversa a unas 20 bases del extremo (figuras 6.7 y 6.8). Las posibles explicaciones alternativas podrían incluir la existencia de formas defectivas del RNA S o mRNAs o, más probablemente, estructuras secundarias en los extremos, debido a la formación del panhandle (en el caso del virus Junín, esta estructura podría extenderse teóricamente hasta 80 nucleótidos).

Es interesante que, independientemente del RNA usado, se producen siempre terminaciones prematuras en la misma posición tanto en Junín como en LCM, lo que afirma la segunda hipótesis. Experimentos de cross-linking químico como los realizados para demostrar la existencia de apareamientos de extremos en influenza (Hsu *et al.*, 1988) y el bunyavirus La Crosse (Raju y Kolakofsky, 1990) permitirían probarla.

Figura 6.10. Clonado del extremo 5' de las formas antigenómicas de los RNAs del virus Junín.

A. Productos obtenidos a partir de RNA celular total y RNA de viriones por transcripción reversa usando el primer N186 (polaridad viral) analizados en un gel de poliacrilamida al 6% y urea 8M. Autorradiografía con exposición de 12 horas.

a. RNA viral purificado de viriones de virus Junin cepa MC2

b. RNA total extraído de células BHK-21 infectadas con virus Junín cepa MC2

Las bandas correspondientes al tamaño de 186 nucleótidos se eluyeron por difusión.

B. Producto de amplificación del cDNA poliC, analizado en agarosa al 2% y teñido con bromuro de etidio.

A. Marcador de tamaño Phi-X-174 cortado con HincII

B. Amplificación del cDNA obtenido a partir de RNA de viriones.

C. Amplificación del cDNA obtenido a partir de RNA de células infectadas.

C. Análisis de restricción de los productos amplificados en agarosa 4%. Los cortes se realizaron con las enzimas HindIII y EcoRI.

A y B. Marcador de tamaño Phi-X-174 cortado con HincII y Phi-X-174 cortado con HinfI

C. Amplificación del cDNA obtenido a partir de RNA de viriones.

D. Amplificación del cDNA obtenido a partir de RNA de células infectadas.

Figura 6.11. Secuencia nucleotídica del extremo 5' de las formas antigenómicas de los RNAs del virus Junín.

Se muestran los geles de secuenciación correspondiente a dos de los clones obtenidos.

SECUENCIA DEL EXTREMO 5' DE LAS FORMAS VIRALES COMPLEMENTARIAS DEL RNA S DEL VIRUS JUNIN CEPA MC2

	1	10	20	30	40	50	Nº de clones
(G?)	CGCACAGTGGATCCTAAGGCATAGTGTCTAACACTTTTCACTGAGCAATTT						8
AGA(G?)	CGCACAGTGGATCCTAAGGCATAGTGTCTAACACTTTTCACTGAGCAATTT						2
ATA(G?)	CGCACASTGGATCCTAAGGCATAGTGTCTAACACTTTTCACTGAGCAATTT						1

6.5 DISCUSION

La región intergénica del RNA S actúa como señal de terminación de la transcripción.

Los resultados descriptos en este capítulo muestran que, tal como se supuso, la región intergénica del virus Junín actúa como terminador de la transcripción generando el mRNA subgenómico. Estos resultados concuerdan con los recientemente informados por Iapalucci *et al.* (1991). Los resultados de *Northern blot*, que mostraban un tamaño de aproximadamente 1,8 kb para el mRNA N fueron el primer indicio al respecto.

Por otra parte, el conocimiento de la secuencia de la región intergénica con una potencial estructura en horquilla y resultados publicados que mostraban a las regiones de la estructura secundaria estable en forma de horquillas como potenciales terminadores de transcripción en procariotas (Platt, 1986; Hayashi *et al.*, 1983, Emery y Bishop, 1988; Tuerk *et al.*, 1988) llevaron a considerar firmemente esta posibilidad.

Además, la transcripción *in vitro* de la región intergénica del virus Junín clonada en el vector pGEM, mostró capacidad de terminar la transcripción a la altura de los hairpins por parte de la RNA polimerasa de T7, aunque de una manera menos específica que lo que cabría esperar para la replicasa viral (Figura 6.10). Dado que en las condiciones de trabajo son improbables las estructuras cruciformes del DNA (Panayotatos y Wells, 1981), es posible que sea la horquilla en formación en el extremo 3' del RNA que se está sintetizando la que determine la terminación. Este mecanismo es conocido en procariotas (Berthalamy *et al.*, 1987) y eucariotas (Birchmeier *et al.*, 1983).

De todos modos queda por resolver el mecanismo por el cual la transcripción del mRNA puede continuar a través de la región intergénica dando lugar a la forma antigenómica del RNA S, e iniciando de esta manera el ciclo de replicación.

La replicación del RNA S requiere un antiterminador.

La transcripción de RNAs virales en células tratadas con inhibidores de síntesis de proteínas e infectadas con el virus Junín muestran

que el inicio de la transcripción no necesita la maquinaria de traducción, acumulándose a lo largo del tiempo sólo el mRNA N. Por el contrario, la replicación viral requiere la síntesis de proteínas, sugiriendo un mecanismo de antiterminación que permite la copia de RNAs completos.

El antiterminador debería ser una de las cuatro proteínas virales (o bien una proteína celular de alto recambio). Tanto la proteína Z como la N pueden ser candidatos a actuar como antiterminadores.

Salvato y Shimomaye (1989), consideran a la proteína Z semejante a *Tat* del virus HIV-1, que tiene una función de transactivador (Sodroski et al., 1986). La proteína *Tat*, con un dominio de aminoácidos básicos y una estructura de zinc-finger potencial es capaz de ligar RNA (Dingwall et al., 1989), ser transportada al núcleo y activar la transcripción (Frankel et al., 1988; Subramanian et al., 1990).

Aunque Z no contiene un dominio de aminoácidos básicos, puede ser considerada una proteína importante en la replicación debido a que su mRNA se halla en los viriones de los virus LCM y Tacaribe (Salvato y Shimomaye, 1989; N. López, comunicación personal) y es probable que sea traducido inmediatamente después de la entrada del virus a la célula.

De todas maneras, Z podría ser una proteína de función *Tat* (sin los aminoácidos básicos) o bien del tipo M, con capacidad de integrarse a la nucleocapside por pegado a RNA y ayudar en el proceso de ensamblado (M. Salvato, comunicación personal). La proteína M1 de varios virus con genoma da RNA negativo tiene capacidad de pegado a RNA, presentando también una secuencia de zinc-finger potencial (Wakefield y Brownlee, 1989).

En el caso de la proteína N, la abundancia de grupos de aminoácidos básicos y su capacidad para unirse al RNA viral la convierten en un candidato para la función de antiterminador. Esta hipótesis encuentra apoyo en aspectos de la replicación de virus de RNA negativos que han sido descritos y en algunos ejemplos de antiterminadores procariotas y eucariotas, tal como se discutió en el capítulo 3 (véase tabla 3.4).

Una estructura de terminación-antiterminación semejante se ha descrito para el operón *bgl* de *E.coli* (involucrado en el uso de beta-glucósidos aromáticos) (Houman et al., 1990) y en el fago λ cuya proteína N es capaz de actuar como antiterminador por pegado a la estructura en horquilla que forma el mRNA (Barik et al., 1987; Lazinski et al., 1987).

La transcripción y replicación sería un proceso regulado por N.

La replicación de rabdovirus, paramixovirus, ortomixovirus y bunyavirus requiere síntesis *de novo* de proteínas, tal como se ha descrito para los arenavirus Tacaribe (Franze Fernández et al., 1987) y Junín. Estos virus muestran los dos eventos descritos: transcripción de formas subgenómicas (mRNAs) y replicación, dando formas antigenómicas de longitud completa. Desde hace bastante tiempo se conoce que la replicación requiere la síntesis de factores protéicos (Wertz y Levine, 1973; Eshita et al., 1985; Raju y Kolakofski, 1986a; 1986b; Bellocq et al., 1987). Sin embargo, el mecanismo de *stop-start* o de *switching* es aún desconocido (Ball y Wertz, 1981), si bien hay hipótesis recientes para explicar el proceso en los paramixovirus (Vidal et al., 1990).

En VSV se requiere, al menos, la proteína N para que la RNA polimerasa sintetice RNA *in vitro*. Las proteínas NS y M no pueden sustituir el efecto de N, si bien NS en conjunto con N hace más eficiente la transcripción (Patton et al., 1984; Wertz et al., 1987; Peluso y Moyer, 1988). Este fenómeno puede deberse a que el RNA naciente se ensambla en nucleocápsides al mismo tiempo que es transcrito.

La proteína N existe en un pool celular durante la infección, el cual se mantiene más o menos constante. Esto, demostrado en VSV, es muy probable que ocurra en Junín, ya que en estados tempranos (en sentido amplio, hasta 8 horas postinfección) la cantidad de RNA S antigenómico y mRNA N es semejante, en tanto que en infecciones avanzadas (más de 4 días post infección) se acumula mayor cantidad de RNA S. Esto se puede explicar como una proporción baja de mRNA que es traducido para mantener el pool de N, respecto a una mayor cantidad de RNA S antigenómico. Este último se replica a su vez, para producir copias de RNA S viral, que usaría el pool de N para encapsidarse.

El modelo, basado en los experimentos realizados con VSV y los resultados de esta tesis para los arenavirus, se esquematiza en la figura 6.13.

En ausencia de proteína N, la transcripción a partir del RNA S genómico produce el mRNA N, que termina en la estructura de hairpin del extremo 3'. Esto permitiría la acumulación de proteína N por traducción del mRNA. La proteína N, al alcanzar una cierta concentración, bloquearía la formación de la horquilla del extremo 3' del mRNA N y en consecuencia

Figura 6.12. Efecto de la región intergénica del virus Junín en la terminación de la transcripción.

Análisis de los transcritos in vitro en geles de poliacrilamida al 6% y urea 8M. Autorradiografía obtenida con una exposición de 3 minutos con pantalla amplificadora. La reacción se llevó a cabo con RNA polimerasa del fago T7, de modo de generar sondas de polaridad viral.

Las flechas indican la posición de los transcritos correspondientes a los tamaños aproximados de 600 y 300 pb. A la izquierda se esquematizan las construcciones usadas.

A- Recombinante pGEMHAIR cortado con la enzima HindIII. Produce transcritos de longitud completa y formas de menor tamaño.

B- Recombinante pGEMHAIR digerido con la enzima SmaI que corta a la altura del primer hairpin. Se observa que se produce un sólo tipo de transcrito de longitud semejante al de menor tamaño producido por la construcción que tiene el hairpin completo.

Figura 6.13. Esquema de la regulación del paso transcripción-replicación.

La explicación del mecanismo se encuentra en el texto.

Figura 6.14. Esquema general para la replicación de los arenavirus.

permitiría el paso de la replicasa para formar el RNA S antigenómico. En estas condiciones a partir del RNA S antigenómico se sintetiza el mRNA de GPC y la forma genómica del RNA S, reiniciando el ciclo de replicación (Figura 6.14).

De todos modos debería haber un nivel de RNA que escape a la antiterminación para poder tener un nivel basal de N celular.

Dentro del modelo propuesto, el nivel de N se regula por el RNA transcripto, que "secuestra" la proteína N. Por otra parte concentraciones de N altas podrían llevar a la agregación de la misma (*), existiendo de esa manera una concentración máxima posible.

Además debería considerarse que, cuando la síntesis de RNA S (genómico o antigenómico) aumente por encima de un valor máximo, los niveles de mRNA N (y GPC) disminuyan y, por lo tanto, sea menor la cantidad de N disponible para formar nucleocápsides. En estas condiciones, cuando los niveles de N estén por debajo de un mínimo capaz de encapsidar el RNA S, esta especie no se va a formar y, al no poder inhibirse la formación del hairpin, vuelve a producirse mRNA N, aumentando el nivel de la proteína (Hacker et al. (1989) ha descripto para el bunyavirus La Crosse un mecanismo de regulación de la producción de mRNA N por encapsidación del mismo).

La regulación general de este mecanismo, podría aún ser más compleja. En el operón *bgl* de *E.coli* el nivel de antiterminación es regulado por el nivel de fosforilación del antiterminador. Lo mismo se conoce en VSV, donde el proceso de replicación se encuentra regulado por el nivel de fosforilación e la fosfoproteína (Chattopadhyay y Banerjee, 1987). Para los arenavirus no se podría asegurar lo mismo, pero de hecho Pichinde y LCM (y probablemente los demás arenavirus) presentan formas fosforiladas y no fosforiladas de N, aspectos que deberían estudiarse en relación a la regulación de la transcripción. Por otra parte es muy poco lo que se conoce de la transcripción del RNA L, que no debería ser independiente de la regulación del RNA S, ya que determinaría los niveles de actividad de replicasa en la célula.

(*) Este fenómeno fue demostrado por Wertz et al., 1987 en la proteína N de VSV. Se ha observado, además que la proteína N del virus Lassa (Barber et al., 1991) y del virus Junín, forma agregados insolubles cuando se purifica a partir de productos clonados en vectores de expresión (resultados no publicados de nuestro laboratorio).

La transcripción del RNA S se inicia por un mecanismo de cap-snatching.

La secuencia completa del RNA S permitió el diseño de primers para el análisis por extensión de primer. Estos experimentos mostraron la existencia de bases no templadas más allá del extremo 5' determinado por secuenciación del cDNA correspondiente al RNA S viral.

Los experimentos de *Northern blot* y de ensayo de protección a RNasas mostraron que en los viriones hay un solo tamaño de RNA, tal como ocurre en las nucleocápsides intracelulares usadas en el virus Tacaribe.

Esto, sumado a los experimentos de extensión de primers, nos hace suponer que tanto la forma genómica como antigenómica del RNA S de los viriones tienen un extremo 5' homogéneo. Su longitud es concordante con el tamaño esperado por extensión de primers sobre la secuencia del cDNA correspondiente al RNA S viral.

Las formas intracelulares, además de la forma extendida de la misma longitud que el RNA S de los viriones, presentan una serie de bases (1-6 en LCM, no más de 3 o 4 en Junín) no templadas.

Esto no es nuevo para los virus a RNA negativo, ya que influenza y bunyavirus tiene el mismo tipo de extensión, de hasta 18-21 bases. En estos virus, la distribución de la longitud de bases no templadas es gaussiana, habiéndose descrito en los viriones una actividad de endonucleasa dependiente del capping del mRNA, que cliva los RNAs celulares usados como primers (Kolakofsky y Altman, 1978; Plotch et al., 1978). Este mecanismo se conoce en influenza (Bouloy et al., 1978; Krug et al., 1980; Krug, 1983) y bunyavirus (Bishop et al., 1983; Patterson et al., 1984; Eshita et al., 1985; Bouloy et al., 1990).

Con respecto a la iniciación en arenavirus, durante la redacción de esta tesis Garcin y Kolakofsky (1990) publicaron un trabajo indicando que tanto la forma genómica como antigenómica contienen una G en su extremo 3' (posición +1) en tanto que la extensión de primers efectuada hacia el extremo 5' de los RNAs antigenómicos muestra que existe una base no templada de posición -1, que resultó ser una G no apareada. Por otra parte el uso de anticuerpos anti-cap permitió encontrar la estructura 7^mGpppG en el extremo 5' de los RNAs de polaridad genómica y antigenómica de los mRNAs. El modelo propuesto por Garcin y Kolakofsky, supone que la replicación comienza a partir de pppGpC creando una G no templada en -1. Este mecanismo, denominado de *copy-back*, fue descrito originalmente para VSV por Schubert et al. (1979).

Los resultados mostrados son coherentes con los ya publicados y sugieren para los arenavirus un mecanismo de *cap-snatching*.

Si bien el primer utilizado en la amplificación de los productos de primer sobre RNA de células y de viriones no permite identificar la G extra en el extremo 5', es probable que los hallazgos de Garcin y Kolakofsky (1990) en Tacaribe y Pichinde, también sean aplicables a los RNAs del virus Junín.

De todos modos, los mecanismos de transcripción de los arenavirus y su regulación están recién ahora comenzando a descifrarse parcialmente. Es indudable que sólo cuando se desarrolle un sistema *in vitro* eficiente se resolverán una gran cantidad de los interrogantes que aún quedan pendientes.

6.6. CONCLUSIONES

1. Los viriones del virus Junín encapsidan tanto la forma viral (mayoritaria) como viral complementaria del RNA S.
2. El mRNA transcripto a partir del gen N se detecta por *Northern blot*, al menos dos horas después de la infección.
3. La terminación de la transcripción del mRNA N se debería a la potencial estructura secundaria de la región intergénica. Los mRNAs N podrían formar una horquilla de aproximadamente $\Delta G = -57$ kcal/mol, que provocaría la liberación de la replicasa.
4. La transcripción del RNA S completo (replicación) requiere un antiterminador.
5. Las propiedades fisicoquímicas de la proteína N (en particular, su capacidad de unirse a RNA) y el hecho de que la transcripción primaria sólo produce mRNA N, mientras que la transcripción de la copia completa del RNA S requiere de la síntesis de proteínas, soportan la hipótesis que postula a la proteína de la nucleocápside como posible antiterminador. Así la proteína N debería unirse al mRNA naciente para evitar la formación de la horquilla del extremo 3' y la consecuente liberación de la replicasa.

6. El mecanismo de inicio de la transcripción es semejante al descripto para influenza y bunyavirus, de tipo *cap-snatching*, presentando bases no templadas en el extremo 5' de los mRNAs que podrían corresponder a RNAs celulares usados como primer.

7. La secuencia del extremo 5' de los RNAs antígenómicos confirman que los 19 nucleótidos del extremo 3' del RNA S del virus Junín son iguales al resto de los arenavirus.

7. CONSIDERACIONES GENERALES

8. BIBLIOGRAFIA

- Abelson, H.T., Smith, G.H., Hoffman, H.A. & Rowe, P.W. (1969) Use of enzyme-labelled antibody for electron microscope localization of LCM virus antigens in infected cell cultures. *J. Natl. Cancer Inst.* **42**, 497-515.
- Añón, M.C., Grau, O., Martínez Segovia, Z.M. & Franze-Fernández, M.T. (1976) RNA Composition of Junín Virus. *J. Virol.* **18**, 833-838.
- Arata, A.A. & Gratz (1975) The structure of rodents faunas associated with arenaviral infections. *Bull. WHO* **52**, 621-627
- Aribalzaga, R.A. (1955) Una nueva enfermedad epidémica a germen desconocido: hipertermia nefrotóxica, leucopénica y enantemática. *Día Médico* **27**, 1204-1210.
- Arikawa, J., Lapenotiere, H., Iacono-Connors, L., Wang, M. & Schmaljohn, C. (1990) Coding properties of the S and M genome segments of Sapporo Rat Virus: comparison to other causative agent of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Virology* **176**, 114-125.
- Armstrong, C., Lillie, R.D. (1934) Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic. *Public Health Rep.* **49**, 1019-1027.
- Armstrong, C., Sweet, L.K. (1939) Lymphocytic choriomeningitis. Report of two cases, with recovery of the virus from gray mice (*Mus musculus*) trapped in the two infected households. *Public Health Rep.* **54**, 673-684.
- Auperin, D., Dimock, K., Cash, P., Rawls, W.E. & Bishop, D.H.L. (1982a) Analysis of the genome of prototype Pichinde arenavirus and a virulent derivative of Pichinde Munchique. Evidence for sequence conservation at the 3' termini of their viral RNA species. *Virology* **116**, 363-367.
- Auperin, D.D., Compans, R.W. & Bishop, D.H.L. (1982b) Nucleotide sequence conservation at the 3' termini of the virion RNA species of New World and Old World arenaviruses. *Virology* **121**, 200-203.
- Auperin, D.D., Galinski, M.S. & Bishop, D.H.L. (1984a) The sequences of the N protein gene and intergenic region of the S RNA of Pichinde arenavirus. *Virology* **134**, 208-219.
- Auperin, D.D., Romanowski, V., Galinski, M.S. & Bishop, D.H.L. (1984b) Sequencing studies of Pichinde arenavirus S RNA indicate a novel coding strategy, an ambisense viral S RNA. *J. Virol.* **52**, 987-904.
- Auperin, D.D., Sasso, D.R. & McCormick, J.B. (1986) Nucleotide sequence of the glycoprotein gene and intergenic region of the Lassa virus S genome RNA. *Virology* **154**, 155-167.
- Auperin, D.D., Esposito, J.J., Lange, J.V., Bauer, S.P., Knigh, J., Sasso, D.R. & McCormick, J.B. (1988) Construction of a recombinant vaccinia virus expressing the Lassa virus glycoprotein gene and protection of guinea pigs from a lethal Lassa virus infection. *Virus Res.* **9**, 233-248
- Ausubel, F.M. (1987) Current protocols in Molecular Biology. J. Wiley & Sons, N.Y.

Ayerra de Holstein, B., Gutman Frugone, L. & Teyssie, A.R. (1971) Susceptibilidad de un cultivo mixto Hela-rata frente a dos cepas de virus Junín. *Medicina (Buenos Aires)* 31, 215-221.

Babykin, M.M. & Zinchenko, V.V. (1984) Rapid separation of DNAs by buoyant density in three layer gradients. *Analyt.Biochem.* 137, 175-181.

Bandziulis, R.J., Swanson, M.S. & Dreyfuss, G. (1989) RNA-binding proteins as developmental regulators. *Genes and Development* 3, 431-437.

Banerjee, S.N., Buchmeier, M.J. & Rawls, W.E. (1975/76) Requirements of cell nucleus for the replication of an arenavirus. *Intervirology* 6, 190-196.

Barber, G.N., Clegg, C.S. & Lloyd, G. (1990) Expression of the Lassa virus nucleocapsid protein in insect cells infected with a recombinant baculovirus: application to diagnostic assays for Lassa virus infection. *J. Gen. Virol.* 71, 19-28.

Baric, R.S., Nelson, G.W., Fleming, J.O., Deans, R.J., Keck, J.G., Casteel, N. & Stohlman, S.A. (1988) Interaction between Coronavirus nucleocapsid protein and viral RNAs implications for viral transcription. *J. Virol.* 62(11), 4280-4287.

Barik, S., Ghosh, B., Whalen, W., Lazinski, D. & Das, A. (1987) An antitermination protein engages the elongation transcription apparatus at a promoter-proximal recognition site. *Cell* 50, 885-899.

Barret,, A.T.D. & Dimmock, N.J. (1986) Defective interfering viruses and infections of animals. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 128, 55

Barthelemy, I., Salas, M. & Mellado, R.P. (1987) In vivo transcription of bacteriophage D29 DNA: transcription termination. *J. Virol.* 61, 1751-1755.

Bayley, J.M. & Davidson, N. (1976) Methylmercury as a reversible denaturing agent for agarose gel electrophoresis. *Analyt.Biochem.* 70, 75-85.

Bellocq, C. & Kolakofsky, D. (1987) Translational requirement for La Crosse Virus S-mRNA synthesis: a possible mechanism. *J. Virol.* 61(12), 3960-3967.

Bellocq, C., Raju, R., Petterson, J. & Kolakofsky, D. (1987) Translational requirement of La Crosse Virus S-mRNA synthesis: *in vitro* studies. *J. Virol.* 61(1), 87-95.

Bishop, D.H.L., Gould, K.G., Akashi, H. & Clerx-Van Haaster, C.M. (1982) The complete sequence and coding content of snowshoe hare bunyavirus small (S) viral RNA species. *Nucl. Acids Res.* 10, 3703-3713.

Bishop, D.H.L., Gay, M.E. & Matsuoka, Y. (1983) Nonviral heterogeneous sequences are present at the 5' ends of one species of snowshoe hare bunyavirus S complementary RNA. *Nucl. Acids Res.* 11, 6409-6418.

Bishop, D.H.L. (1990) Arenaviruses and their replication. *In* Fields, Ed. *Virology*.

- Birchmeier, C., Folk, W. & Birstiel, M.L. (1983) The terminal stem loop structure and 80 bp of spacer DNA are required for the formation of 3' termini in sea urchin M24 mRNA. *Cell* 35, 433-440.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Boersma, D.P., Saleh, F., Nakamura, K. & Compans, R.W. (1982) Structure and glycosylation of Tacaribe viral glycoproteins. *Virology* 123, 452-456.
- Bohn, W., Rutter, G., Hokenberg, H., Mannweiler, K. & Nobis, P. (1986) Involvement of actin filaments in budding of measles virus: studies on cytoskeletons of infected cells. *Virology* 149, 91-106.
- Bonner, W.M. & Laskey, R.A. (1974). A film detection method for tritium labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46, 83-88.
- Bouloy, M., Plotch, S.J. & Krug, R.M. (1978) Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 4886-4890.
- Bouloy, M., Pardigon, N., Vialat, P., Gerbaud, S. & Girard, M. (1990) Characterization of the 5' and 3' ends of viral messenger RNA isolated from BHK21 cells infected with Germiston virus (Bunyavirus). *Virology* 175, 50-58.
- Brady, J., Bolen, J.B., Radonovich, M., Salzman, N. & Khoury, G. (1984) Stimulation of simian virus 40 late gene expression by simian virus 40 tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2040-2044.
- BRL (1986) BRL pUC host: *E.coli* DH5alphaTM competent cells. *Focus* 8, 9.
- Bruno-Lobo, G.G., Bruno-Lobo, M., Johnson, K.M., Webbs, P.A. & De Paola, V. (1968) Pathogenesis of Junin virus infection in the infant hamster. *An. Microbiol. (Rio de Janeiro)* 15, 11-33.
- Bruns, M., Cihak, J., Müller, G., Lehmann-Grube, F. (1983a) Lymphocytic choriomeningitis virus. VI. Isolation of a glycoprotein mediating neutralization. *Virology* 130, 247-251.
- Bruns, M., Martinez Peralta, L., Lehmann-Grube, F. (1983b) Lymphocytic choriomeningitis virus. III. Structural proteins of the virion. *J. Gen. Virol.* 64, 599-611.
- Bruns, M., Zeller, W., Rohdewohld, H., Lehmann-Grube, F. (1986) Lymphocytic choriomeningitis virus. IX. Properties of the nucleocapsid. *Virology* 151, 77-85.
- Bruns, M., Kratzberg, T., Zeller, W. & Lehmann-Grube, F. (1990) Mode of replication of lymphocytic choriomeningitis virus in persistently infected cultivated mouse L cells. *Virology* 177, 615-624.
- Buchmeier, M.J., Gee, S.R., Rawls, W.E. (1977) Antigens of Pichinde virus. I. Relationship of soluble antigens derived from infected BHK-21 cells to the structural components of the virion. *J. Virol.* 22, 175-186.

- Buchmeier, M.J., Elder, J.H. & Oldstone, M.B.A. (1978a). Protein structure of Lymphocytic Choriomeningitis Virus: identification of virus structural and cell-associated polypeptides. *Virology* 89, 133-145.
- Buchmeier, M.J. & Oldstone, M.B.A. (1978b) Identity of the viral protein responsible for serological cross-reactivity among the Tacaribe complex arenaviruses in Negative Strand Viruses and the Host Cell (BJW Mahy & R.D. Barry, eds.) pp. 91-97. Academic Press, New York .
- Buchmeier, M.J. & Oldstone, M.B.A. (1979) Protein structure of lymphocytic choriomeningitis virus: evidence for a cell-associated precursor of the virion glycopeptides. *Virology* 99, 111-120.
- Buchmeier, M.J., Lewicki, H.A., Tomori, O. & Oldstone, M.B.A. (1981) Monoclonal antibodies to Lymphocytic choriomeningitis and Pichinde viruses: generation, characterization and cross-reactivity with other arenaviruses. *Virology* 113, 73-85.
- Buchmeier, M.J. & Oldstone, M.B.A. (1981) Molecular studies of LCM virus-induced immunopathology: development and characterization of monoclonal antibodies to LCM virus. In: Bishop, D.H.L., Compans R.W. eds. *Replication of negative strand viruses*. New York: Elsevier, 71-78.
- Buchmeier, M.J. & Parekh, B.S. (1987) Protein structure and expression among arenaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 133, 41-57.
- Buchmeier, M.J., Southern, P.J., Parekh, B.S., Wooddell, M.K. & Oldstone, M.B.A. (1987) Site-specific antibodies define a cleavage site conserved among arenaviruses GP-C glycoproteins. *J. Virol.* 61, 982-985.
- Bullock, W.O., Fernández, J.M. & Short, J.M. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376
- Burnette, N.W. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of protein from SDS-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radiolabeled protein A. *Analyt. Biochem.* 112, 195-203.
- Burns, J., Salvato M. & Buchmeier, M.J. (1990) Molecular architecture of lymphocytic choriomeningitis virus. VIII International Congress of Virology, Berlín (RFA). Resúmen W3-001.
- Bushar, G. & Sagripanti, J.L. (1990) Method for improving accuracy of virus titration" standarization of plaque assay for Junin virus. *J. Vir. Methods* 30, 99-108
- Carter, M.F., Biswal, N., Rawls, W.E. (1973) Characterization of nucleic acid of Pichinde virus. *J. Virol.* 11, 61-68.
- Casals, J., Buckley, S.M. & Cedeno, R. (1975) Antigenic properties of the arenaviruses. *Bull WHO* 52, 421-427.
- Cervera, M., Dreyfuss, G. & Penman, S. (1981) Messenger RNA is translated when associated with the cytoskeletal framework in normal and vesicular stomatitis virus infected Hela cells. *Cell* 23, 113-120.

- Clegg, J.C.S. & Lloyd, G. (1983) Structural and cell-associated proteins of Lassa virus. *J. gen. Virol.* **64**, 1127-1136.
- Clegg, J.C.S. & Lloyd, G. (1987) Vaccinia recombinant expressing Lassa-virus internal nucleocapsid protein protects guinea pigs against Lassa fever. *Lancet* **8552**, 186-188.
- Clegg, J.C.S. & Oram, J.D. (1985) Molecular cloning of Lassa-virus RNA: nucleotide sequence and expression of the nucleocapsid protein gene. *Virology* **144**, 363-372.
- Clegg, J.C.S., Wilson, S.M. & Oram, J.D. (1990) Nucleotide sequence of the S RNA of Lassa virus (Nigerian strain) and comparative analysis of arenavirus gene products. *Virus Res.* **18**, 151-164.
- Compans, R.W., Boersma, D.P., Cash, P. et al. (1981) Molecular and genetic studies of Tacaribe, Pichinde, and lymphocytic choriomeningitis virus. In *Replication of negative strand viruses* (Eds. D.H.L. Bishop & R.W. Compans) pp 31-42. Elsevier, New York.
- Compans, R.W. & Bishop, D.H.L. (1985) Biochemistry of arenaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **114**, 153-177.
- Coto, C.E., Help, G.I. & Tkaczewski, L.Z. (1972) Biological properties of Junín virus purified from infected mouse brain. *Medicina (Buenos Aires)* **32**, 281-286.
- Coto, C.E., León, M.E., Martínez Peralta, L., Help, G.I. & Laguens, P. (1979) Production of infectious virus and viral surface antigen in Vero cells persistently infected with Junín virus. In *Humoral immunity in neurological diseases* (Eds. D. Karcher, A. Lowenthal & A.D. Strosberg) pp. 405-415. Plenum Press, Nueva York.
- Cresta, B., Padula, P. & Martínez Segovia, Z.M. (1980) Biological properties of Junín virus proteins, I. identification of the immunogenic glycoprotein. *Intervirology* **13**, 284-288.
- Chatterjee, P.K., Cervera, M. & Penman, S. (1984) Formation of vesicular stomatitis virus nucleocapsid from cytoskeletal framework-bound N protein: possible model for structure assembly. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 2231-2234.
- Chattopadhyay, D. & Banerjee, J. (1987) Phosphorylation within a specific domain of the phosphoprotein of vesicular stomatitis virus regulates transcription *in vitro*. *Cell* **49**, 407-414.
- Chen, C. & Okayama, H. (1987). High efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2745-2752.
- Chinault, D.N., Thompson, H.A. & Gangemi, J.D. (1981) Polypeptide synthesis catalysed by components of Pichinde virus disrupted by detergent. *J. Gen. Virol.* **55**, 213-217.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., McDonald, R.J. & Rutter, W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294-5299.

- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. *Analyt. Biochem.* **162**, 156-159.
- Chou, P.Y. & Fasman, G. (1978) Empirical predictions of protein conformation. *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 251-276.
- D'Aiutolo, A.C. & Coto, C.E. (1986) Vero cells persistently infected with Tacaribe virus: role of interfering particles in the establishment of the infection. *Virus Res.* **6**, 235-244.
- Dalton, A.J., Rowe, W.P. Smith, G.H. Wilsnack, R.E. & Pugh, W.E. (1968) Morphological and cytochemical studies on lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* **2**, 1465-1478.
- Damonte, E., Mersich, S.E. & Coto, C.E. (1982) Interacciones entre arenavirus por sobreinfección cruzada de líneas infectadas persistentemente. *Resúmenes del III Congreso Argentino de Microbiología*, G-173.
- d'Aubenton Carafa, Y., Brody, E. & Thermes, C. (1990) Prediction of Rho-independent *Escherichia coli* transcription terminators. A statistical analysis of their RNA stem-loop structures. *J. Mol. Biol.* **216**, 835-858.
- De Mitri, M.I. & Martínez Segovia, Z. (1971) Phytohemagglutinin unresponsiveness in leukopenia induced by Junin virus in Guinea pigs. *Acta Virol.* **16**, 234-238.
- De Mitri, M.I. & Martínez Segovia, Z. (1980) Biological activities of Junin virus proteins, II. Complement fixing polypeptides associated with the soluble antigen and purified virus particles. *Intervirology* **14**, 84-90.
- De Mitri, M.I. & Martínez Segovia, Z.M. (1985) Polypeptide synthesis in Junin virus-infected BHK21 cells. *Acta Virologica* **29**, 97-103.
- Denhardt, D.T. (1966) A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **23**, 641-653.
- Denis, N., Corcos, D., Kruh, J. & Kitzis, A. (1988) A rapid and accurate method for quantitating total RNA transferred during Northern blot analysis. *Nucl. Acids Res.* **16**, 2354.
- Dingwall, C. & Laskey, R. (1986) Protein import into the cell nucleus. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **2**, 367-390.
- Dingwall, C., Robbins, J., Dilworth, S.M., Black, S.J., Roberts, B. & Richardson, W.D. (1988) The nucleoplasmin nuclear location sequence is larger and more complex than that of SV40 large T antigen. *J. Cell. Biol.* **107**, 841-849.
- Domec, C.; Garbay, B.; Fournier, M. & Bonnet, J. (1990) cDNA library construction from small amount of unfractionated RNA: association of cDNA synthesis with polymerase chain reaction amplification. *Analyt. Biochem.* **188**, 422-426.
- Dreyfuss, G. (1986) Structure and function of nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein particles. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **2**, 459-498.

Dreyfuss, G., Swanson, M.S. & Piñol-Roma, S. (1988) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. *Trends biochem. Sci.* 13, 86-91.

Dulbecco, R. (1952) Production of plaques in monolayers tissue culture by single particles of an animal virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 38, 747-756.

Dutko, F.J., Wright, E.A. & Pfau, C.J. (1976) The rNAs of defective interfering Pichinde virus. *J. Gen. Virol.* 31, 417-427.

Dutko, F.J. & Pfau, C.J. (1978) Arenaviruses defective interfering particles mask the cell killing potential of standard virus. *J. Gen. Virol.* 38, 195-204.

Dutko, F.J., Kennedy, S.I. & Oldstone, M.B.A. (1981) Genome structure of lymphocytic choriomeningitis virus: complementary termini. *In* Bishop, D.H.L. & Compans, R.W. Eds. "The replication of negative strand viruses" pp 43-48. Elsevier, New York.

Dzgne, N., Goldstein, J.A., Friend, D.S. & Felgner, P.L. (1989) Fusion of liposomes containing a novel cationic lipid N-[2,3-(dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium: induction by multivalent anions and asymmetric fusion with acidic phospholipids vesicles. *Biochemistry* 28, 9179-9184.

Eaton, B., Hyatt, A. & White, J. (1987) Association of bluetongue virus with the cytoskeleton. *Virology* 157, 107-116.

Eckhardt, S.G., Milich, D.R. & McLachlan, A. (1991) Hepatitis B virus core antigens has two nuclear localization sequences in the arginine-rich carboxil terminus. *J. Virol.* 65, 575-582.

Elliot, R.M. (1990) Molecular biology of Bunyavirus. *J. Gen. Virol.* 71, 501-522.

Emery, V.C. & Bishop, D.H.L. (1987) Characterization of Punta Toro S mRNA species and identification of an inverted complementary sequence in the intergenic region of Punta Toro Plebovirus ambisense S RNA that is involved in mRNA transcription termination. *Virology* 156, 1-11.

Enders, J.F. (1954) Cytopathology of virus infections. *Ann. Rev. Microbiol.* 8, 473-497.

Eshita, Y., Ericson, B., Romanowski, V. & Bishop, D.H.L. (1985) Analyses of the mRNA transcription processes of snowshoe hare bunyavirus S and M RNA species. *J. Virol.* 55(3), 681-689.

Farber, F.E. & Rawls, W.E. (1975) Isolation of ribosome-like structures from Pichinde virus. *J. Gen. Virol.* 26, 21-31.

Fasman, G. (1989) Protein conformation prediction. *TIBS* 14, 295-299.

Feinberg, A.P. & Volgelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analyt. Biochem.* 132, 6-14.

Felgner, P.L., Gadek, T., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. & Danielsen, M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 7413-7417.

Fenner, F., Mc Auslan, B.R., Mims, C.A., Sambrook, J & White, D.D. (1974) *The biology of animal viruses.* Academic Press, New York.

Francis, S.J., Southern, P.J., Valsamakis, A. & Oldstone, M.B.A. (1987) State of viral genome and protein during persistently Lymphocytic Choriomeningitis Virus infections. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **133**, 67-88.

Francis, S.J. & Southern, P.J. (1988) Molecular analysis of viral RNAs in mice persistently infected with Lymphocytic Choriomeningitis Virus. *J. Virol* **62**, 1251-1257.

Franze-Fernández, M.T.; Zetina, C.; Iapalucci, S.; Lucero, M.A.; Boissou, C.; López, R.; Rey, O.; Daheli, M.; Cohen, G. & Zalein, M. (1987) Molecular structure and early events in the replication of Tacaribe Arenavirus S RNA. *Virus Research* **7**, 309-324.

Fuller-Pace, F.V. & Southern, P.J. (1988) Temporal analysis of transcription and replication during acute infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* **162**, 260-263.

Fuller-Pace, F.V. & Southern, P.J. (1989) Detection of virus-specific RNA-dependent RNA polymerase activity in extracts from cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus: *in vitro* synthesis in full-length viral RNA species. *J. Virol.* **63**, 1938-1944.

Galinski, M., Mink, M & Pons, M. (1988) Molecular cloning and sequence analysis of the human parainfluenza 3 virus gene encoding the L protein. *Virology* **165**, 499-510.

Gangemi, J.D., Rosato, R.R., Connell, E.V., Johnson, E.M. & Eddy, G.A. (1978) Structural polypeptides of Machupo virus. *J. Gen. Virol.* **41**, 183-188.

Garay, R.P. (1975) Patogenia de la encefalitis por virus Junín: estudios en ratón lactante. *Medicina (Bs. As.)* **31**, 383-392.

Garcin, D. & Kolakofsky, D. (1990) A novel mechanism for the initiation of Tacaribe arenavirus genome replication. *J. Virol.* **64**, 6196-6203.

Gard, G.P., Vezza, A.C., Bishop, D.H.L. & Compans, R.W. (1977) Structural proteins of Tacaribe and Tamiami virions. *Virology* **83**, 85-95.

Ghiringhelli, P.D., Rivera, R.V., Baro, N., Grau, O. & Romanowski, V. (1987) Molecular cloning of Junín virus RNA. VII International Congress of Virology (Edmonton, Canada), abstract OP3.10, pp 253.

Ghiringhelli, P.D., Rivera-Pomar, R.V., Lozano, M., Grau, O. & Romanowski, V. (1991) Molecular organization of Junin virus S RNA: complete nucleotide sequence, relationship with the other members of Arenaviridae and unusual secondary structures. *J. Gen. Virol.* (en prensa).

- Gibson, T.J. (1984) Studies on the Epstein-Barr virus genome. Tesis Doctoral, Cambridge University, Cambridge, Inglaterra. In Sambrook et al. (1989) Apéndice R2, "Appendix References".
- Giménez, H.B., Compans, R.W. (1980) Defective interfering Tacaribe virus and persistently infected cells. *Virology* 107, 229-239.
- Gluzman, Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175-182.
- Goding, J.W. (1978) Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. *J. Immunol. Methods* 20, 241-253.
- Golub, E. (1988) "One minute" transformation of competent *E.coli* by plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 16, 1641
- Gorman, C. (1986) High efficiency gene transfer into mammalian cells. In DNA cloning (Ed. D.M. Glover) Vol II, pp 143-190. IRL Press, Oxford, Inglaterra.
- Gotoh, H., Shioda, T., Sakai, Y., Mizumoto, K. & Shibuta, H. (1989) Rescue of Sendai Virus from viral ribonucleoprotein-transfected cells by infection with recombinant Vaccinia Virus carrying Sendai Virus L and P/C genes. *Virology* 171, 434-443.
- Grau, O.; Franze-Fernández, M.T.; Romanowski, V.; Rustici, S.M. & Rosas, M.F. (1981) Junin Virus Structure. In: The Replication of Negative Strand Viruses (D.H.L. Bishop & R.W. Compans eds.) pp. 11-14, Elsevier North Holland.
- Grunstein, M. & Hogness, D.S. (1975) Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNA that contains a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3961-3965.
- Gschwender, H.H., Brummund, M., Lehmann-Grube, F. (1975) Lymphocytic choriomeningitis virus. I. Concentration and purification of the infectious virus. *J. Virol.* 15, 1317-1322.
- Gubler, U. & Hoffman, B.J. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25, 263-269.
- Gubler, U. (1988) A one tube reaction for the synthesis of blunt-ended double-stranded cDNA. *Nucl. Acids Res.* 16, 2726.
- Hacker, D., Raju, R. & Kolakofsky, D. (1989) La Crosse virus nucleocapsid protein controls its own synthesis in mosquito cells by encapsidating its mRNA. *J. Virol.* 63, 5166-5174.
- Hahn, Ch.S., Hahn, Y.S., Rice, C.M., Lee, E., Dalgarno, L., Strauss, E.G. & Strauss, J.H. (1987) Conserved elements in the 3' untranslated region of Flavivirus RNAs and potential cyclization sites. *J. Mol. Biol.* 198, 33-41.
- Hamaguchi, M., Nishikawa, K., Toyoda, T., Yoshida, T., Hanaichi, T. & Nagai, Y. (1985) Transcriptive complex of Newcastle disease virus. II. Structural and functional assembly associated with the cytoskeletal framework. *Virology* 147, 295-308.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166, 557-580.

Harnish, D., Dimock, K., Leung, W.C., Rawls, W. (1981) Immunoprecipitable polypeptides in Pichinde virus infected BHK-21 cells. En: Bishop, D.H.L., Compans, R.W., eds. The replication of negative strand viruses. New York: Elsevier, 23-29.

Harnish, D.G., Leung, W.C. & Rawls, W.E. (1981) Characterization of polypeptides immunoprecipitable from Pichinde Virus infected BHK-21 cells. J. Virol. 38, 840-848.

Harnish, D.G., Dimock, K., Bishop, D.H.L. (1983) Gene mapping in Pichinde virus: assignment of viral polypeptides to genomic L and S RNAs. J. Virol. 46(2), 638-641.

Hayashi, M.N., Hayashi, M. & Müller, U.R. (1983) Role for the J-F intercistronic region of bacteriophage ϕ X74 and G4 in stability of mRNA. J. Virol. 48, 186-196.

Hayashi, K., Nakazawa, M., Ishizaki, Y., Hiraoka, N. & Obayashi, A. (1986) Regulation of inter- and intramolecular ligation with T4 DNA ligase in the presence of polyethylenglycol. Nucl. Acids Res. 14, 7617-7631

Help, G.I. & Coto, C.E. (1980) Génesis de partículas interferentes durante la multiplicación del virus Junín *in vivo*. Medicina (Bs. As.) 40, 531-536.

Help, G.I., Coto, C.E. & Tkaczewski, L.Z. (1970) Evaluación de un método de purificación del virus Junín. Medicina (Buenos Aires) 30, 15-21.

Higgins, D.G. & Sharp, P.M. (1988) CLUSTAL: a package for performing multiple sequences alignments on a microcomputer. Gene 73, 237-244.

Higgins, D.G. & Sharp, P.M. (1989) Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. CABIOS 5, 151-153.

Hill, V.M., Marnell, L. & Summers, D.F. (1981) *In vitro* replication and assembly of vesicular stomatitis virus nucleocapsids. Virology 113, 109-118.

Horzinek, M.C. (1987) Molecular pathogenesis of virus infections. Experientia 43, 1193-1196.

Hotchin, J. (1974) The role of transient infection in Arenavirus persistence. Progr. Med. Virol. 18, 81-93.

Houman, F., Díaz-Torres, M. & Wright, A. (1990) Transcriptional antitermination in the *bgI* operon of *E. coli* is modulated by a specific RNA binding protein. Cell 62, 1153-1163.

Howard, C. & Simpson, D. (1980) The biology of arenaviruses. J. Gen. Virol. 51, 1-14.

- Howard, C. & Buchmeier, M.J. (1983) A protein kinase activity in lymphocytic chorio-meningitis virus and identification of the phosphorylated product using monoclonal antibody. *Virology* 126, 538-547.
- Howard, C.R., Lewicki, H., Allison, L., Slater, M. & Buchmeier, M.J. (1985) Properties and characterization of monoclonal antibodies to Tacaribe virus. *J. Gen. Virol.* 66, 1385-1395.
- Howard, C. (1986) Arenaviruses. *In Perspectives in Medical Virology* (Ed. A. J. Zuckerman) Elsevier, Amsterdam.
- Hsu, M.; Parvin, J.D.; Gupta, S.; Krystal, M. & Palese, P. (1987) Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal pan handle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8140-8144.
- Huang, A.S. & Baltimore, D. (1970) Defective viral particles and viral disease processes. *Nature* 226: 325-327
- Huang, A.S. & Baltimore, D. (1977) Defective interfering animal viruses. *In Comprehensive virology* (Ed. H. Fraenkel-Conrat & R.R. Wagner) vol. 10, pp. 73-116. Plenum Press, Nueva York.
- Iapalucci, S., López, R., Rey, O., López, N., Franze-Fernández, M.T., Cohen, G.N., Lucero, M., Ochoa, A. & Zakin, M.M. (1989a) Tacaribe virus L gene encodes a protein of 2210 amino acid residues. *Virology* 170, 40-47.
- Iapalucci, S., López, N., Rey, O., Zakin, M.M., Cohen, G.N. & Franze-Fernández, M.T. (1989b) The 5' region of Tacaribe virus L RNA encodes a protein with a potential metal binding domain. *Virology* 173, 357-361.
- Iapalucci, S., López, N. & Franze-Fernández, M.T. (1991) The 3' end of the Tacaribe arenavirus subgenomic RNAs. *Virology* 182, 269-278.
- Inokuchi, Y. & Hirashima, A. (1987) Interference with viral infection by defective RNA replicase. *J. Virol.* 61, 3946-3949
- Jacobson, S., Pfau, C.J. & Dutko F.J. (1979) Determinants of spontaneous recovery and persistence in MDCK cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Gen. Virol.* 44, 113-121.
- Johnson, K.M., Webb, P.A. & Justines, G. (1973) Biology of Tacaribe-complex viruses, in *Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Other Arenaviruses* (F. Lehmann-Grube, ed.) pp. 241-258, Springer, Berlin.
- Kandjian, E.W. (1986) UV crosslinking of RNA to nylon membranes enhances hybridization signals. *Mol. Biol. Rep.* 11, 107-115.
- Karlovsky, P. & Prell, H.H. (1987) Screening of pUC plasmid clones for inserts based on growth rate (without X-gal). *Nucl. Acids Res.* 15, 6753.
- Kaufman, R.J. & Sharp, P.A. (1982) Amplification and expression of sequences co-transfected with modular *dhfr* cDNA gene. *J. Mol. Biol.* 159, 501-521

- Kaufman, R.J. (1985) Identification of the components necessary for adenovirus translational control and their utilization in cDNA expression vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 689-693.
- Kedersha, N.L. & Rome, L.H. (1990) Vaults: large cytoplasmic RNP's that associate with cytoskeletal elements. *Mol. Biol. Rep.* 14, 121-122.
- Kiley, M.P., Tomori, O., Regnery, R.L. & Johnson, K.M. (1981) Characterization of the Arenaviruses Lassa and Mozambique. *In* Replication of Negative Strand Viruses (Eds. D.H.L. Bishop and R.W. Compans) pp. 11-14. Elsevier North Holland, Inc.
- Kingsbury, D.W., Jones, I. & Murti, K.G. (1987) Assembly of influenza ribonucleoprotein in vitro using recombinant nucleoprotein. *Virology* 156, 396-403.
- Klavinskis, L.S. & Oldstone, M.B.A. (1989) Lymphocytic Choriomeningitis Virus selectively alters differentiated but not housekeeping functions: block in the expression of growth hormone gene is at the level of transcription initiation. *Virology* 168, 232-235.
- Kolakofsky, D. & Altman, S. (1978) Endoribonuclease activity associated with animal RNA viruses. *J. Virol.* 25, 274-284.
- Kolakofsky, D.B. & Raju, R. (1987). The translational requirements for La Crosse Virus S-mRNA synthesis. *C.S.H. Symp. Quant. Biol.* 52, 373-379.
- Kozak, M. (1978) How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell* 15, 1109-1123.
- Kozak, M. (1984) Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eucaryotic mRNAs. *Nucl. Acids Res.* 12, 857-872.
- Krug, R.M. (1981) Priming of Influenza viral RNA transcription by capped heterologous RNAs. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 93, 125-149.
- Krug, R.M., St. Angelo, C., Broni, B. & Shapiro, G. (1987) Transcription and replication of Influenza virion RNA in the nucleus of infected cells. *C.S.H. Symp. Quant. Biol.* LII, 353-358.
- Kyu L. & Chae C.-B. (1989) A simple assay for DNA transfection by incubation of the cells in culture dishes with substrates for β -galactosidase. *BioTechniques* 7, 576-580.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227, 680-685.
- Lascano, E.F. & Berriá, M.I. (1970) Microscopía electrónica de cultivos primarios de fibroblastos de ratón inoculados con virus Junín. *Medicina (Buenos Aires)* 29, 487-493.
- Lascano, E.F. & Berriá, M.I. (1974) Ultrastructure of Junín virus in mouse whole brain & mouse brain tissue culture. *J. Virol.* 14, 965-974.

- Laskey, R.A. (1980) The use of intensifying screens or organic scintillators for visualizing radioactive molecules resolved by gel electrophoresis. *Meth. Enzymol.* 65, 363-365.
- Lazinski, D., Grzadzielska, E. & Das, A. (1989) Sequence-specific recognition of RNA hairpins by bacteriophages antiterminators requires a conserved arginine-rich motif. *Cell* 59, 207-218.
- Lazzarini, R.A., Keene, J.D. & Schubert, M. (1981) The origins of defective interfering particles of negative-strand RNA viruses. *Cell* 26, 145-154.
- Le, S.-Y., Malim, M.H., Cullen, B.R. & Maizel, J.V. (1990) A highly conserved RNA folding region coincident with the Rev response element of primate immunodeficiency. *Nucl. Acids Res.* 18, 1613-1623.
- Lepine, P., Mollaret, P., Kreis, B. (1937) Receptivite de l'homme au virus murin de la choriomeningite lymphocytaire. Reproduction experimentale de la meningite lymphocytaire benigne. *C.R. Acad. Sci. Paris* 204, 1846-1848.
- Lehmann Grube, F. (1971) Lymphocytic Choriomeningitis virus. *Viol. Monogr.* 10, 1-174.
- Lehmann Grube, F., Martínez Peralta, L., Bruns, M. & Löhler, J. (1983) Persistent infection of mice with the lymphocytic choriomeningitis virus. In *Comprehensive Virology* (Eds. H. Fraenkel Conrat & R.R. Wagner) vol 18 pp 43-103. Plenum Press, Nueva York.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. & Boedtker, H. (1977) RNA molecular weight determination by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16, 4743-4751.
- Leung, W.C. & Rawls, W.E. (1977) Virion-associated ribosomes are not required for the replication of Pichinde virus. *Virology* 81, 174-176.
- Leung, W.C., Leung, M.F.K.L. & Rawls, W.E. (1979) Distinctive RNA transcriptase, polyadenylic acid polymerase and polyuridylic acid polymerase activities associated with Pichinde virus. *J. Virol.* 30, 98-107.
- Leung, W.C., Harnish, D., Ramsingh, A., Dimock, K., Rawls, W.E. (1981) Gene mapping in Pichinde virus. In: Bishop, D.H.L., Compans, R.W., eds. *The replication of negative strand viruses*. New York: Elsevier, 51-57.
- Levis, R., Weiss, B.G., Tsiang, M., Huang, H. & Schlesinger, S. (1986) Deletion mapping of Sindbis virus DI RNAs derived from cDNAs defines the sequences essential replication and packaging. *Cell* 44, 137-145.
- Lopata, M.A., Cleveland, D.W., Sollner-Webb, B. (1984). High-level expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran-mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide and glycerol shock treatment. *Nucl. Acids Res.* 12, 5707.
- López, R.A. & Franze-Fernández, M. T. (1985) Effect of Tacaribe virus infection on host cell protein and nucleic acid synthesis. *J. Gen. Virol.* 66, 1753-1761.
- López, R.A., Grau, O. & Franze-Fernández, M. T. (1986) Effect of actinomycin D on arenavirus growth and estimation of the generation time for a virus particle. *Virus Res.* 5, 213-220.

López, R.A. (1986) Arenavirus: su interacción con la célula hospedadora. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.

Lukashevich, T.S., Lemeshko, N.N., Stelmakh, T.A., Golubev, V.P. & Stcheslenok (1985) Some biochemical properties of Lassa virus RNA and polypeptides. *Med. Microbiol. Immunol.* 175, 73-78.

Lusky, M. & Botchan, M. (1981) Inhibition of SV40 replication in simian cells by specific pBR322 DNA sequences. *Nature* 293, 79-81.

Luthman, H. & Magnusson, G. (1983). High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucl.Acids Res.* 11, 1295-1308.

Makino, S., Shieh, C.-K., Soe, L.H., Baker, S.C. & Lai, M.M.C. (1988) Primary structure and translation of defective interfering RNA of murina coronavirus. *Virology* 166, 550-560.

Maiztegui, J.I. (1975) Clinical and epidemiological patterns of Argentine haemorrhagic fever. *Bull. WHO* 52, 3385-575.

Maiztegui, J.I., Laguens, R.P., Cossio, P.M., Casanova, M.B., de la Vega, M.T., Ritacco, V., Segal, A., Fernández, N.J. & Arana, R.M. (1975) Ultrastructural and immunohistochemical studies in five cases of Argentine hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* 132, 35-43.

Maiztegui, J.I. & Sabbattini, M.S. (1977) Extensión progresiva del area endémica de fiebre hemorragica argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 37 Supl. 3, 162-166.

Maiztegui, J.I., Feuillede, M. & Briggiler, A. (1986) Progressive extension of the endemic area and changing incidence of AHF. *Med. Microbiol. Immunol.* 175, 149-152.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1985) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

Mannweiler, K. & Lehmann-Grube, F. (1973) Electron microscopy of LCM virus-infected L cells. In: "Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Other Arenaviruses" (F. Lehmann-Grube, ed.) pp. 37-48, Springer, Berlin.

Martin, K. & Helenius, A. (1991) Transport of incoming influenza virus nucleocapsid into the nucleus. *J. Virol.* 65, 232-244.

Martínez Segovia, Z.M., Holstein, B.A. & Grazioli, F. (1967) Multiplicación del virus Junín en cultivo de tejidos. *Ciencia e Investigación* 23, 35-39.

Martínez Segovia, Z.M. & Díaz, A. (1968) Purification of Junín virus by an aqueous biphasic polymer system. *Appl. Microbiol.* 15, 1602-1604.

Martínez Segovia, Z.M. & Grazioli, F. (1969) The nucleic acid of Junín virus. *Acta Virol.* 13, 264-268.

Martínez Segovia, Z.M. & De Mitri, M.I. (1977) Junín virus structural proteins. *J. Virol.* 21, 579-583.

Maxam, A. & Gilbert, M. (1980) Sequencing endlabeled DNA with base specific chemical cleavages. *Meth.Enzymol.* 65, 499-560.

Melton, D.A., Krieg, P.A., Regabliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. & Green, M.R. (1984) Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucl. Acids Res.* 12(18), 7035-7056.

Mersich, S.E. Damonte, E.B. & Coto, C.E. (1981) Induction of RNA polymerase II activity in Junín virus-infected cells. *Intervirology* 16, 123-127.

Mettler, N.E., Buckley, S.M. & Casals, J. (1961) Propagation of Junín virus, the etiological agent of Argentine Hemorrhagic Fever, in HeLa cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 107, 684-688.

Mettler, N.E., Casals, J. & Shope, R.E. (1963) Study of antigenic relationship between Junín virus, the etiological agent of Argentine Hemorrhagic Fever, and other arthropode borne viruses. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 12, 647-652.

Miquel, M.-C., Bittner, D., Rome, L.H. & Kedersha, N.L. (1988) Vaults are ribonucleoprotein structure found in both higher and lower eukaryotes. *J. Cell Biol.* 107, 120.

Mims, C.A. & Subrahmanyam, T.P. (1966) Immunofluorescence study of the mechanism of resistance to superinfection in the mice carrying lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Path. Bact.* 91, 403-415.

- Mottet, G., Curran, J. & Roux, L. (1990) Intracellular stability of non-replicating paramyxovirus nucleocapsids. *Virology* 176, 11-7.
- Mukaigawa, J. & Nayak, D.P. (1991) Two signal mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2. *J. Virol.* 65, 245-253.
- Murphy, F.A., Webb, P.A., Johnson, K.M., Whitfield, S.G. (1969) Morphological comparison of Machupo with lymphocytic choriomeningitis virus: basis for a new taxonomic group. *J. Virol.* 4, 535-541.
- Murphy, F.A., Webb, P.A., Johnson, K.M., Whitfield, S.G. & Chappel, W.A. (1970) Arenaviruses in Vero cells: ultrastructural studies. *J. Virol.* 6, 507-518.
- Murphy, F.A., Whitfield, S.G., Webb, P.A. & Johnson, K.M. (1973) Ultrastructural studies of arenaviruses. In *Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Other Arenaviruses* (Ed. F. Lehmann Grube) pp 273-285. Springer-Verlag, Viena.
- Murphy, F.A. & Whitfield, S.G. (1975) Morphology and morphogenesis of arenaviruses. *Bull. WHO* 52, 409-419.
- Murti, K.G. & Goora, R. (1983) Interaction of frog virus-1 with cytoskeleton. I. Altered organization of microtubules, intermediates filaments and microfilaments. *J. Cell. Biol.* 96, 1248-1257.
- Murti, K.G. & Goora, R. (1990) Interaction of Frog Virus 3 with the cytoskeleton. VIII International Congress of Virology, Berlin (RFA). Resumen W43-001.
- Nuss, D.L., Oppermann, H. & Koch, G. (1975) Selective blockage of initiation of host protein synthesis in RNA-virus-infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72(4), 1258.
- Ofodile, A., Padnos, M., Molomot, N., Duffy, J.L. (1973) Morphological and biological characteristics of the M-P strain of lymphocytic choriomeningitis virus. *Infect. Immun.* 7, 309-315.
- Ohuchi, M., Orlich, M., Ohuchi, R., Simpson, B.E.J. Garten, W., Klenk, H.D. & Rott, R. (1989) Mutations at the cleavage site of the hemagglutinin alter the pathogenicity of influenza virus A/Chick/Penn/83(H5N2). *Virology* 168, 274-280.
- Oldstone, M.B.A., Holmstoen, J. & Welsh, R.M.Jr (1977) Alteration in acetylcholine enzymes in neuroblastoma cells persistently infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Cell Physiol.* 91, 459-472.
- Oldstone, M.B.A. & Buchmeier, M.J. (1982) Restricted expression of viral glycoproteins in cells of persistently infected mice. *Nature* 300, 360-362.
- Oldstone, M.B.A.; Rodríguez, M.; Danghaday, W.H. & Lamperf, P.W. (1984) Viral perturbation of endocrine function: Disordered cell function leads to disturbed homeostasis and disease. *Nature* 307, 278-281.

- Olsen, H.S., Nelbock, P., Cochrane, A.W. & Rosen, C.A. (1990) Secondary structure is the major determinant for interaction of HIV *rev* protein with RNA. *Science*, **247**, 845-848.
- Oubiña, J.R., Alison, L. & Howard, C.R. (1990) ARN polimerasa ARN dependiente del virus Pichinde: detección de la actividad enzimática y síntesis *in vitro* de ARN viral. IIIer Congreso Argentino de Virología. Resumen 7.
- Padula, P. & Martínez Segovia, Z.M. (1984) Replication of Junín virus in the presence of tunicamycin. *Intervirology* **22**, 227-231.
- Paglioni, S. (1972) The brains of suckling mice infected with Junín virus: fractionation and study. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* **14**, 37-42.
- Palmer, E.L., Obijeski, J.F., Webb, P.A. & Johnson, K.M. (1977) The circular segmented nucleocapsid of an arenavirus Tacaribe virus. *J. Gen. Virol.* **36**, 541-545.
- Panayotatos, N. & Wells, R.D. (1981) Cruciform structures in supercoiled DNA. *Nature* **289**, 466-470.
- Pande, H., Terramani, T., Tressel, T., Churchill, M.A., Hawkins, G.G. & Zaia, J.A. (1990) Altered expression of fibronectin gene in cells infected with human cytomegalovirus. *J. Virol.* **64**, 1366-1369.
- Parodi, A.S., Greenway, D.J., Rugiero, H.R., Rivero, E., Frigerio, M.J., Mettler, N.E., Garzon, F., Boxaca, M., Guerrero L.B. de, & Nota, N.R. (1958) Sobre la etiología del brote epidémico en Junín. *Día Médico* **30**, 2300-2302.
- Parodi, A.S., de la Barrera, J.M., Rugiero, H.R., Greenway, D.J., Yerga, M., Mettler, N.E., Boxaca, M. & Frigerio, M.J. (1959a) Los reservorios del virus de la fiebre hemorrágica epidémica de la provincia de Buenos Aires. *Prensa Med. Arg.* **46**, 554-556.
- Parodi, A.S., Rugiero, H.R., Greenway, D.J., Mettler, N.E., Martínez, A., Boxaca, M. & de la Barrera, J.M. (1959b) Aislamiento del virus Junín (FHE) de los ácaros de las zonas epidémicas (*Echinolaeps echidninus* Berlese). *Prensa Med. Arg.* **46**, 2242-2244.
- Pasian, E.L., Fernández Cobo, M., Padula, P., De Mitri, M.I. & Martínez Segovia, Z. (1983) Presence of actin on Junin virus. *Comunicaciones Biológicas* **2**, 25-30.
- Patterson, J.L., Holloway, B. & Kolakofski, D. (1984) La Crosse virions contains a primer stimulated RNA polymerase and a methylated cap dependent endonuclease. *J. Virol.* **52**, 215-222.
- Pedersen, I.R. (1970) Density gradient centrifugation studies on lymphocytic choriomeningitis virus and on viral ribonucleic acid. *J. Virol.* **6**, 414-420.
- Pedersen, I.R. (1971) Lymphocytic choriomeningitis virus RNAs. *Nature (Lond)* **234**, 112-114.
- Pedersen, I.R. (1973) LCM virus: its purification and its chemical and physical properties. En: Lehmann-Grube, F. ed. *Lymphocytic choriomeningitis virus and other arenaviruses*. Berlin: Springer-Verlag, 13-23.

- Pedersen, I.R., Konigshofer, E.P. (1976) Characterization of ribonucleo-proteins and ribosomes isolated from lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* 20, 14-21.
- Pedersen, I.R. (1979) Structural components and replication of arenaviruses. *Adv. Virus Res.* 24, 277-330.
- Peränen, J. & Kääriäinen, L. (1991) Biogenesis of type I cytopathic vacuoles in Semliki Forest virus-infected BHK cells. *J. Virol.* 65, 1623-1627.
- Pereira, H.G. (1961) The cytopathic effect of animal viruses. *Adv. Virus Res.* 8, 245
- Pfau, C.J. (1974) Biochemical and biophysical properties of the arenaviruses. *Prog. Med. Virol.* 18, 64-80.
- Pfau, C.J., Bergold, G.H., Casals, J., Johnson, K.M., Murphy, F.A., Pedersen, I.R., Rawls, W.E., Rowe, W.P., Webb, P.A. & Weissenbacher, M.C. (1974) Arenaviruses. *Intervirology* 4, 207-210.
- Platt, T. (1986) Transcription termination and the regulation of gene expression. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 339-372.
- Pleij, C.W.A. (1990) Pseudoknots in noncoding regions of viral RNAs. VIII International Congress of Virology, Berlin (RFA). Resumen P49-020.
- Plotch, S.J., Bouloy, M., Ulmanen, I. & Krug, R.M. (1981) A unique cap^m7GpppXm-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped mRNAs to generate the primers that initiates viral RNA transcription. *Cell* 23, 847-858.
- Popescu, M., Schaeffer, H. & Lehmann-Grube, F. (1976) Homologous interference of lymphocytic choriomeningitis virus detection and meassurment of interference focus unit. *J. Virol.* 20, 1-7.
- Popescu, M. & Lehmann-Grube, F. (1977) Defective interfering particles in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 77, 78-83.
- Portela, A., Melero, J.A., Martínez, C., Domingo, E. & Ortín, J. (1985). Oriented synthesis and cloning of influenza virus nucleoprotein cDNA that leads to its expression in mammalian cells. *Virus Res.* 4, 69-82.
- Priano, C., Kramer, F.R. & Mills, D.R. (1987) Evolution of the RNA coliphages: the role of secondary structures during RNA replication. *C.S.H. Symp. Quant. Biol.* 52, 321-330.
- Raju, R. & Kolakofsky, D. (1986a) Inhibitors of protein synthesis inhibit both La Crosse virus S-mRNA and S genome synthesis in vivo. *Virus Res.* 5, 1-9.
- Raju, R. & Kolakofsky, D. (1986b) Translational requeriments of La Crosse virus S-mRNA synthesis: in vivo studies. *J. Virol.* 61, 96-103.

Raju, R. & Kolakofsky, D. (1989) The ends of La Crosse virus genome and antigenome RNAs within nucleocapsids are base paired. *J. Virol.* 63, 122-128.

Raju, R., Raju, L., Hacker, D. Garcin, D., Compans, R. & Kolakofsky, D. (1990) Non templated bases at the 5' ends of Tacaribe virus mRNAs. *Virology* 174, 53-59.

Ramos, B.A., Courtney, R.J. & Rawls, W.E. (1972) The structural proteins of Pichinde virus. *J. Virol.* 10, 661-667.

Ramsingh, A.I., Dimock, K., Rawls, W.E., Leung, W.C. (1980) Size estimation of Pichinde virus RNA by gel electrophoresis under denaturing conditions. *Intervirology* 14, 31-36.

Rawls, W.E., Banerjee, S.N., McMillan, C.A., Buchmeier, M.J. (1976) Inhibition of Pichinde virus replication by actinomycin D. *J. Gen. Virol.* 33, 421-434.

Rawls, W.E., Buchmeier, M.J. (1976) Arenaviruses: purification and physiochemical nature. *Bull WHO* 52, 393-401.

Rawls, W.E., Chan, M.A. & Gee, S.R. (1981) Mechanism of persistence in arenavirus infections: a brief review. *Can. J. Microbiol.* 27, 568-574.

Rey, O., Rossi, J.P.F.C., López, R., Iapalucci-Espinoza, S. & Franze-Fernández, M.T. (1988) Tacaribe virus infections may induce inhibition of the activity host cell Ca^{2+} and Na^+/K^+ pumps. *J. Gen. Virol.* 69, 951-954.

Rey, O. (1990) Efecto temprano en la interacción del virus Tacaribe con la célula hospedadora y mecanismos implicados. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Rigby, P.W.J., Dickermann, M., Rhodes, C. & Berg, P. (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113, 237-345.

Rivers, T.M., Scott, T.F.M. (1935) Meningitis in man caused by a filterable virus. *Science* 81, 439-440.

Riviere, Y., Ahmed, R., Southern, P.J., Buchmeier, M.J., Dutko, F.J. & Oldstone, M.B.A. (1985a) The S RNA segment of lymphocytic choriomeningitis virus codes for the nucleoprotein and the glycoproteins 1 and 2. *J. Virol.* 53, 966-968.

Riviere, Y., Ahmed, R., Southern, P.J., Buchmeier, M.J. & Oldstone, M.B.A. (1985b) Genetic mapping of Lymphocytic Choriomeningitis Virus pathogenicity: virulence in guinea pigs is associated with the L RNA segment. *J. Virol.* 55, 704-709.

Romanowski, V. (1981) Estructura bioquímica del virus Junin. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Romanowski, V. & Bishop, D.H.L. (1983) The formation of Arenaviruses that are genetically diploid. *Virology* 126, 87-95.

Romanowski, V. & Bishop, D.H.L. (1985) Conserved sequences and coding of two strains of lymphocytic choriomeningitis virus (WE and ARM) and Pichinde arenavirus. *Virus Research* 2, 35-51.

Romanowski, V.; Matsuura, Y. & Bishop, D.H.L. (1985) Complete sequence of the S RNA of lymphocytic choriomeningitis virus (WE strain) compared to that of Pichinde arenavirus. *Virus Research* 3, 101-114.

Rosas, M.F. (1984) Bioquímica de virus: estructura de la envoltura del virus Junín. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Rosas, M.F.; Romanowski, V. & Grau, O. (1988) The phospholipid composition of arenaviruses. *Anal. Asoc. Quím. Argent.* 76, 269-283.

Rowe, W.P., Pugh, W.F., Webb, P.A. & Peters, C.J. (1970a) Serological relationships of the Tacaribe complex of viruses to lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* 5, 289-292.

Rowe, W.P., Murphy, F.A., Bergold, G.H., Casals, J., Hotchin, J., Johnson, K.M., Lehmann-Grube, F., Mims, C.A., Traub, E. & Webb, P.A. (1970b) Arenaviruses: Proposed name for a newly defined virus group. *J. Virol.* 5, 651-652.

Ruo, S.L., Mitchell, S.W., Kiley, M.P., Roumillat, L.F., Fisherhoch, S.P. & McCormick, J.B. (1991) Antigenic relatedness between Arenavirus defined at the epitope level by monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 72, 549-555

Rustici, S.M. (1984) Desarrollo *in vitro* del virus Junín, proteínas intracelulares. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina

Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Ehrlich, H.A. & Arnheim, N. (1985) Enzimatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.

Saleh, F., Gard, G.P. & Compans, R.W. (1979) Synthesis of Tacaribe viral proteins. *Virology* 93, 369-376.

Salvato, M., Shimomaye, E. & Oldstone, M.B.A. (1989) The primary structure of the lymphocytic choriomeningitis virus L gene encodes a putative RNA polymerase. *Virology* 169, 377-384.

Salvato, M. & Shimomaye, E.M. (1989) The completed sequence of lymphocytic choriomeningitis virus reveals a unique RNA structure and a gene for a zinc finger protein. *Virology* 173, 1-10.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

Sanchez, A., Pifat, D.Y., Kenyon, R.H., Peters, C.J., McCormick, J.B. & Kiley, M.P. (1989) Junin virus monoclonal antibodies: Characterization and crossreactivity with other arenaviruses. *J. Gen. Virol.* 70, 1125-1132.

- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5466.
- Sanger, F. & Coulson, A.R. (1978) The use of thin acrylamide gel for DNA sequencing. *FEBS Lett.* **87**, 107-110.
- Scolaro, L., Castilla, V., Candurra, N., Mersich, S. & Damonte, E. (1990) Virus Junín: funcionalidad de la glicoproteína de la envoltura en la determinación de su comportamiento biológico. IIIer Congreso Argentino de Virología. Resumen 8.
- Schubert, M., Keene, J.D. & Lazzarini, R.A. (1979) A specific internal RNA polymerase recognition site of VSV RNA is involved in the generation of DI particles. *Cell* **18**, 749-757.
- Schwartz, R.M. & Dayhoff, M.O. (1979) Atlas of protein sequence and structure (Ed. M.O. Dayhoff), pp. 353-358. National Biomedical Research Foundation, Washington DC.
- Sheiness, D. & Sullivan, D. (1986) Staining RNA in formaldehyde gels. *Focus* **8**, 11
- Simon, K.; Cardamone, J.; Whitaker-Dowling, P.A.; Younger, J.S. & Widnell, C.C. (1990) Cellular mechanism in the superinfection exclusion of vesicular stomatitis virus. *Virology* **177**, 375-379.
- Sommer, R. & Tautz, D. (1989) Minimal homology requirements for PCR primers. *Nucl. Acids Res.* **17**, 6749.
- Southern, P.J. & Berg, P. (1982) Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Gen.*, **1**, 327-341.
- Speir, R.W., Wood, O., Liebhaver, H. & Buckley, S.M. (1970) Lassa fever, a new virus disease of man from west Africa. IV. Electron microscopy of Vero cell cultures infected with Lassa virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **19**, 692-694.
- Staneck, L.D. & Pfau, C.J. (1974) Interfering particles from a culture persistently infected with Parana virus. *J. Gen. Virol.* **22**, 437-440.
- Staneck, L.D., Trowbridge, R.S., Welsh, R.M., Wright, E.A. & Pfau, C.J. (1972) Arenaviruses: cellular response to long-term *in vivo* infection with Parana and lymphocytic choriomeningitis viruses. *Infect. Immun.* **6**, 444-450.
- Stohlman, S.; Baric, R.; Nelson, G.; Soe, L.; Wetter, L. & Deans, R. (1988) Specific interaction between coronavirus leader RNA and nucleocapsid protein. *J. Virol.* **62**, 4288-4295.
- Stoker, M.G.P. & Mc Pherson, I.A. (1961) Studies on transformation of hamster cells by polyoma virus *in vitro*. *Virology* **14**, 631-641.
- Subramanian, T.; Kuppuswamy, M.; Venkatesh, L.; Srinivansan, A. & Chinnadurai, G. (1990) Functional substitution of the basic domain of the HIV-1 trans-activator, tat, with the basic domain of the functionally heterologous rev. *Virology* **176**, 178-183.

Swanson, M.S. & Dreyfuss, G. (1988) Classification and purification properties of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins particles by RNA binding specificities. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2237-2241.

Taylor, W.R. (1987) Protein structure prediction. *In* Nucleic Acid and Protein sequence Analysis, a practical approach. (Ed. M.J. Bishop & C.J. Rawlings), pp 285-322. IRL Press, Oxford, Washington DC.

Tinoco, I.; Borer, P.N.; Dengler, B.; Levine, M.D.; Uhlenbeck, O.C.; Crothers, D.M. & Gralla, J. (1973) Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. *Nature (New Biol.)* 246, 40-41.

Tkaczewski, L.Z. & Boxaca, M.C. (1970) Cambios citoquímicos en células Vero infectadas con algunos virus del grupo Tacaribe. *Medicina (Bs.As.)* 30, 28-37.

Tkaczewski, L.Z. & Correa, J. (1972) Cytopathogenic process in Junin virus infected Vero cells. *Medicina (Bs.As.)* 32, 293-301.

Tordo, M.; Poch, O.; Ermine, A.; Keith, G. & Rougeon, F. (1988) Completion of the Rabies virus genome sequence determination: highly conserved domain among the L (polymerase) proteins of unsegmented RNA viruses. *Virology* 165, 565-576.

Tuerk, C., Gauss, P., Thermes, C., Groebe, D.R., Gayle, M., Guild, N., Stormo, G., D'Aubenton-Caraffa, Y., Uhlenbeck, O.C., Tinoco, I., Brody, E.N. & Gold, L. (1988) CUUCGG hairpins: extraordinarily stable RNA secondary structures associated with various biochemical process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1364-1368

Van der Zeijst, B.A.M.; Bleumink, N.; Crawford, L.V.; Swyryd, A. & Stark, G.R. (1983) Viral proteins and RNAs in BHK cells persistently infected with Lymphocytic Choriomeningitis Virus. *J. Virol.* 48, 262-270.

Veza, A.C., Gard, G.P., Compans, R.W. & Bishop, D.H.L. (1977) Structural components of the arenavirus Pichinde. *J. Virol.* 23, 776-786.

Veza, A.C., Clewley, J.P., Gard, G.P., Abraham, N.Z., Compans, R.W. & Bishop, D.H.L. (1978) Virion RNA species of the arenaviruses Pichinde, Tacaribe and Tamiami. *J. Virol.* 26, 485-497.

Vieira, J. & Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Meth. Enzymol.* 153, 3-24.

Vilches, A.M., Barrera Oro, J.G. & Gutman Frugone, L.F. (1965) Una nueva área epidémica de fiebre hemorrágica argentina iniciada a continuación de una epizootia en población aumentada de roedores silvestres. *II Jornadas Epidemiológicas Argentinas* 3, 359-360.

Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 615-619.

Wagner, R.R. (1984) Cytopathic effects of viruses: a general survey. *In* Comprehensive Virology, Vol. 17: Viral Cytopathology (Ed. H. Fraenkel-Conrat & R.R. Wagner), pp. 1-63. Plenum press, Nueva York.

Wakefield, L. & Brownlee, G.G. (1989). RNA-binding properties of influenza A virus matrix protein M1. *Nucl. Acids Res.* 17, 8569-8580.

- Walseth, T.F. & Johnson, R.A. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 562, 11-31.
- Weissenbacher, M.C. & Damonte, E.B. (1983) Fiebre hemorragica argentina. In: *Adel. Microbiol. Enf. Infecc.* (C. Coto, J. Esparza & R.A. de Torres, Eds.) Vol. 2, pp. 119-171, Buenos Aires - Caracas.
- Welsh, R.M. & Pfau, C.J. (1972) Determinants of lymphocytic choriomeningitis virus interference. *J. Gen. Virol.* 14, 177-183.
- Welsh, R.M., Burner, P.A., Holland, J.J., Oldstone, M.B.A., Thompson, H.A. Villareal, L.P. (1975) A comparison of biochemical and biological properties of standard and defective lymphocytic choriomeningitis virus. *Bull. WHO* 52, 403-408.
- Welsh, R.M. & Oldstone, M.B.A. (1977) Inhibition of immunologic injury of cultured cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus: role of defective interfering virus in regulating viral antigen expression. *J. Exp. Med.* 145, 1449-1468.
- Welsh, R.M. & Buchmeier, M.J. (1979) Protein analysis of defective interfering lymphocytic choriomeningitis virus and persistently infected cells. *Virology* 96, 503-515.
- Wertz, G.W., Howard, M.B., Davis, N. & Patton, J. (1987). The switch from transcription to replication of a negative-strand RNA virus. *CSH Symp. Quant. Biol.* 52, 367-371.
- Whitton, J. L., Gebhardt, J. R., Lewicki, H., Tishon, A. & Oldstone, M. B. A. (1988a) Molecular definition of a major Cytotoxic T-Lymphocyte epitope in the glycoprotein of Lymphocytic Choriomeningitis Virus. *J. Virol.* 62, 687-695.
- Whitton, J. L., Southern, P. J. & Oldstone, M. B. A. (1988b). Analyses of the Cytotoxic T-Lymphocyte responses to glycoprotein and nucleoprotein components of Lymphocytic Choriomeningitis Virus. *Virology* 162, 321-327.
- Wicks, R.J. (1986) RNA molecular weight determination by agarose gel electrophoresis using formaldehyde as denaturant: comparison of RNA and DNA molecular weight markers. *Int. J. Biochem.* 18, 277-278.
- Wilson, S.M. & Clegg, J.C.S. (1991) Sequence analysis of the S RNA of the African Arenavirus Mopeia: an unusual secondary structure feature in the intergenic region. *Virology* 180, 543-552
- Wright, K.E., Salvato, M.S. & Buchmeier, M.J. (1989) Neutralizing epitopes of lymphocytic choriomeningitis virus are conformational and requires both glycosilation and disulphide bonds for expression. *Virology* 171, 417-426.
- Wright, K.E.; Spiro, R.C.; Burns, J.W. & Buchmeier, J.M. (1990) Post-translational processing of the glycoproteins of Lymphocytic Choriomeningitis Virus. *Virology* 177, 175-183.
- Yanish-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strain: nucleotide sequence of M13 mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.

- Yasumura, Y. & Kawatika, Y. (1963) Studies on SV40 virus in tissue culture cells. *Nippon Rinsho* 21, 1201-1215.
- Yeh, C.-T., Liaw, Y.-F. & Ou, J.-H. (1990) The arginine-rich domain of hepatitis B precore and core proteins contains a signal for nuclear transport. *J. Virol.* 64, 6141-6147.
- Yisraeli, J.K., Sokol, S. & Melton, D.A. (1990) A two step model for the localization of maternal mRNA in *Xenopus* oocytes: Involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of Vg1 mRNA. *Development* 108, 289-298.
- Young, P.R., Chanas, A.C. & Howard, C.R. (1981) Analysis of the structure and function of Pichinde virus polypeptides. In: "Negative Strand Virus" (D.H.L. Bishop & R.W. Compans, eds.) pp. 11-14, Elsevier North Holland, Inc.
- Young, P.R., Chanas, A.C., Lee, S.R. & Howard, C.R. (1987) Localization of an arenavirus protein in the nuclei of infected cells. *J. gen. Virol.* 68, 2465-2470.
- Young, P.R. & Howard, C. (1983) Fine structure analysis of Pichinde virus nucleocapsids. *J. Gen. Virol.* 64, 833-842.
- Zagursky, R.J., Baumeister, K., Lomax, N. & Berman, M.L. (1985) Rapid and easy sequencing of large linear double-stranded DNA and supercoiled plasmid DNA. *Gene Anal. Techn.* 2, 89-94.
- Zeller, W., Bruns, M. & Lehmann-Grube, F. (1988). Lymphocytic Choriomeningitis Virus. X. Demonstration of the nucleoprotein on the surface of infected cells. *Virology* 162, 90-97.
- Zeller, W., Bruns, M. & Lehmann-Grube, F. (1986). Viral nucleoprotein can be demonstrated on the surface of lymphocytic choriomeningitis virus-infected cells. *Med. Microbiol. Immunol.* 175, 89-9
- Zinkernagel, R.M. & Doherty, P.C. (1974) Restriction of *in vitro* T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis virus within a synergic or semiallogenic system. *Nature* 248, 701-702.
- Zinkernagel, R.M. & Doherty, P.C. (1977) Major transplantation antigens, viruses and specificity of surveillance T cells. *Contemp. Top. Immunobiol.* 7, 179-220.
- Zinkernagel, R.M., First, T., Hengartner, H. & Althage, A. Susceptibility to lymphocytic choriomeningitis virus isolates correlates directly with early and high cytotoxic T-cell activity, as well as footpad swelling reaction, and all these are regulated by H-2D. *J. Exp. Med.* 162(a), 2125-2141.
- Zuidema, D. (1983) Specific binding sites on RNAs and coat protein of alfalfa mosaic virus involved in genome activation. Tesis Doctoral. Universidad de Leiden (Holanda).

APENDICES

APENDICE 1

SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

TBE (Buffer Tris-Borato-EDTA)

STOCK 10X

Tris base	108 g
Acido Bórico	55 g
EDTA 0,5M pH 8	40 ml

Llevar a 1000 ml finales.

TAE (Buffer Tris-Acetato-EDTA)

STOCK 50X

Tris base	242 g
Acido acético	57 ml
EDTA 0,5M pH 8	100 ml

Llevar a 1000 ml finales.

LB (Medio de Luria para cultivo de bacterias)

Tryptona (Difco)	10 g
Extracto de levadura (Difco)	5 g
NaCl	10 g

Llevar a 1 l con agua y ajustar el pH a 7,4 con NaOH.

LB-Agar

Se usa medio LB, al que se agrega 1,5% p/v de agar (Difco)

TB (*Terrific broth*)

Tryptona (Difco)	12 g
Extracto de levadura (Difco)	24 g
Glicerol	4 ml

Llevar a 900 ml con agua y luego de autoclavar agregar 100 ml de solución de fosfatos: 16,4 g fosfato ácido de potasio y 2,3 g de fosfato diácido de potasio en 100 ml de agua.

APENDICE 2

PLASMIDOS USADOS

pBR322

pBR322 is presented because it served for many years as the workhorse plasmid vector. It has, however, been largely superseded by improved, more efficient vectors.

Note: pBR322 and some of its derivatives form multimers in *recA*⁺ hosts (Bedbrook et al. 1979) and are readily lost from cells during sustained growth in minimal media (Jones et al. 1980; Noack et al. 1981; Skogman et al. 1983). This occurs because pBR322 does not carry a locus (*cer*) that ensures equal partitioning of the plasmid into daughter cells (Summers and Sherratt 1984). Whenever possible, bacteria containing pBR322-based vectors or recombinants should therefore be grown in selective conditions. Derivatives of pBR322 containing the *par* region of pSC101 are, however, available (Zurita et al. 1984). *par*, like *cer*, confers a stable pattern of plasmid inheritance (Skogman et al. 1983).

References: Bolivar et al. (1977b) and Sutcliffe (1979).

pUC18, pUC19

These vectors are identical except that they contain polycloning sites arranged in opposite orientations. pUC plasmids lack the *rop* gene (see page 1.3), which normally is located close to the origin of DNA replication and is involved in the control of copy number. As a result, these plasmids replicate to a much higher copy number than do other plasmids that carry a pMB1 (or ColE1) origin. pUC vectors express the amino-terminal fragment of the *lacZ* gene product (β -galactosidase) and display α -complementation in appropriate hosts (see pages 1.8–1.9). Recombinants can therefore be identified by histochemical screening.

References: Messing (1983), Norrander et al. (1983), and Yanisch-Perron et al. (1985).

In pUC18, the *EcoRI* site lies immediately downstream from *P_{lac}*.
In pUC19, the *HindIII* site lies immediately downstream from *P_{lac}*.

Polycloning Site

pGEM-3

SP6 transcription start

T7 transcription start

GAATACAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATCCCGGTCTCCC

HindIII *SphI* *PstI* *SaI* *XbaI* *BamHI* *SmaI* *KpnI* *SacI* *EcoRI*
AccI *HincII*

In pGEM-4, the polycloning site is in the opposite orientation.

BLUESCRIPT M13 +, M13 -

Bluescript M13 + and M13 - are vectors that contain the bacteriophage M13 origin of DNA replication inserted in opposite orientations into a vector derived from a pUC plasmid that contains bacteriophage T3 and T7 promoters. These vectors can thus be used to generate single-stranded DNA *in vivo*, or RNA *in vitro*, that is complementary to either of the two strands of foreign DNA inserted into the polycloning site.

References: Bluescript M13 -: Short et al. (1988) and the product literature from Stratagene Cloning Systems.

In Bluescript SK (M13-), the *SacI* site lies immediately downstream from the bacteriophage T3 promoter and the *KpnI* site lies immediately downstream from the bacteriophage T7 promoter. In Bluescript KS (M13-), the polycloning site is in the opposite orientation.

APENDICE 5

CONDICIONES OPTIMAS DE TRANSFECCION DE CELULAS POR EL METODO DE FOSFATO DE CALCIO.

Día 1.

Las células BHK-21, en crecimiento exponencial, se repican a cajas de Petri en una cantidad determinada por el diámetro de la caja. Se incuba toda la noche en condiciones estándar. No debe pasarse de las 18 horas de incubación para evitar el crecimiento excesivo.

Día 2.

Cuatro horas antes de transfectar se cambia el medio de cultivo por un volumen determinado de medio fresco y se incuba en atmósfera de 3% de CO₂.

Antes de la transfección se prepara la mezcla de DNA y fosfato de calcio. Inmediatamente antes de agregar el DNA a las células, estas se sacan de la estufa de cultivo, se agrega el DNA y se vuelven a incubar en 3% CO₂. Este procedimiento debe ser rápido para evitar cambios de pH por pérdida de CO₂.

RELACIONES

Caja	Medio en el día 2	Células sembra- das en el día 1	DNA μg	CaCl ₂ μl ²	2X BBS μl
100 mm	10 ml	5x10 ⁵	20	500	500
60 mm	4 ml	2x10 ⁵	8	200	200
35 mm	1,25 ml	6x10 ⁴	2,5	65	65

Día 3

A las 12-16 horas postransfección la monocapa se lava cuidadosamente con PBS y se incuba con medio de cultivo

TABLA SIMPLIFICADA DE EQUIVALENCIAS ENTRE AMINOACIDOS

A = G; P	M = V; F; L; I
C = S; Y	N = D; E; H
D = E; G; N; Q	P = A
E = G; N; Q; D	Q = E; D; H
F = I; L; M; W; Y	R = W; H; K
G = S; D; A; E	S = C; G
H = N; Q; R	T =
I = L; M; V; F	V = I; L; M
K = R	W = Y; L; F; R
L = I; V; W; M; F	Y = C; F; W

A = Ala	F = Phe	K = Lys	P = Pro	T = Thr
C = Cys	G = Gly	L = Leu	Q = Gln	V = Val
D = Asp	H = His	M = Met	R = Arg	W = Trp
E = Glu	I = Ile	N = Asn	S = Ser	Y = Tyr