

03062
4



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional
y de Posgrado del C.C.H.

Instituto de Investigaciones Biomédicas

LIBERACION DE PARTICULAS VIRALES EN CELULAS
INFECTADAS CON ROTAVIRUS SA11

T E S I S

Que para obtener el Grado de
Maestra en Investigación Biomédica Básica
Presenta la Licenciada

CLAUDETTE MUSALEM YOUNES

México, D. F.

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A JUAN PABLO

I N D I C E :

- INTRODUCCION.
- MATERIAL Y METODOS.
 - VIRUS.
 - CULTIVO DE CELULAS.
 - INFECCION.
 - TRATAMIENTO.
 - MEDIOS.
 - HEMAGLUTINACION.
 - ELECTROFORESIS.
- RESULTADOS.
 - ASOCIACION A MEMBRANAS.
 - ASOCIACION A CITOESQUELETO.
- DISCUSION.
- REFERENCIAS.

INTRODUCCION:

Los rotavirus, miembros de la familia Reoviridae, son agentes causantes de diarrea en un gran número de especies de mamíferos incluyendo humanos (1,2,3,4,5). Están formados por un genoma que consta de once segmentos de RNA de doble cadena con pesos moleculares desde $0.2 \cdot 10^6$ a $2 \cdot 10^6$ daltones, que se encuentra recubierto por dos capas proteicas (6,7). La doble capa proteica consta cuando menos de cinco polipéptidos cuyos pesos moleculares varían entre 113 000 y 26 000 daltones. Tres de estas proteínas constituyen la capa interna y las dos restantes forman la capa externa. El componente mayor de la cápside externa es una glicoproteína cuyos carbohidratos son del tipo alta manosa (8,9). Las partículas completas presentan un diámetro de 70 nm. En las preparaciones de rotavirus también se encuentran frecuentemente partículas de 60 nm que corresponden a virus sin capa externa. Estas últimas pueden separarse de las partículas completas por centrifugación isopícnica en gradientes de CsCl. La partícula completa presenta una densidad de 1.36 g/ml y la partícula sin capa externa tiene una densidad de 1.38 g/ml. La infectividad se encuentra asociada a las partículas completas (9,10).

Entre las actividades presentes en el virión se ha descrito la presencia de una RNA polimerasa RNA dependiente, la cual se activa al quitar la capa externa por tratamiento con calor o con un agente quelante como el EDTA (11,12,13). También se ha encontrado que preparaciones de rotavirus de ternera aglutinan eritrocitos de varias especies (14,15). La hemaglutinación es una propiedad de las partículas que contienen la capa externa intacta, pero no todos los rotavirus bovinos, y solo algunas cepas de humano presentan esta actividad. En rotavirus bovino y Rhesus se ha demostrado que el producto del segmento 4 de RNA es el responsable de la actividad hemaglutinante (16).

Existen varios estudios sobre las relaciones antigénicas entre rotavirus de distintas especies. Análisis serológicos de un gran número de cepas de rotavirus han mostrado que los aislados comparten determinantes antigénicos (17,18,19,20). Sin embargo, cuando se comparan estos aislados por pruebas de neutralización son antigenicamente diferentes (21).

Recientemente se han definido dos especificidades serológicas: serotipo y subgrupo. Serotipo se refiere a la especificidad determinada por neutralización de la infectividad viral (22). Esta especificidad, en el rotavirus de simio S111 y en la cepa de humano Wa, reside en el producto génico del segmento 9 de RNA, la glicoproteína de capa externa (22). Parece ser que la mayoría de las especies animales se infectan por rotavirus serotípicamente diferentes, y se han aislado al menos cuatro distintos serotipos en humanos (24). Subgrupo se refiere a la especificidad antigénica asociada con el producto génico del segmento 6 de RNA, el polipéptido principal de la capa interna. Se han identificado dos especificidades antigénicas, designadas como subgrupo 1 y 2 en esta proteína por pruebas de IAHA (24). Dentro de esta proteína se encuentra también otro dominio que es la región antigénica común a todos los rotavirus (25).

El patrón electroforético del genoma segmentado de estos virus ha permitido distinguir virus aislados de distintas especies animales y en muchos casos se ha utilizado aún para distinguir entre virus aislados de individuos de una misma especie (23,26).

Los primeros rotavirus adaptados a crecimiento en cultivo de células fueron el agente O, aislado de lavados intestinales de ovinos y bovinos, y el virus S111, aislado de un lavado rectal de mono. Aunque recientemente se ha logrado el crecimiento en cultivo de rotavirus humano, el S111 se ha utilizado como sistema modelo ya que crece en varias líneas celulares y es morfológicamente

indistinguible del rotavirus humano.

El análisis de SAll purificado ha mostrado que la capa interna de estos virus esta formada por tres polipéptidos: VP1, VP2 y VP6; y la capa externa por dos polipéptidos: VP3 y VP7 (27).

El polipéptido VP3 se rompe específicamente por acción de la tripsina, lo que resulta en la formación de dos polipéptidos de menor peso molecular denominados VP5 y VP8 (27,28,29). Este rompimiento específico produce un aumento en la infectividad de hasta 1000 veces. Se ha descrito que el rompimiento por tripsina no afecta la eficiencia ni la velocidad de unión del virus a la célula, sino que activa a las partículas facilitando su "uncoating" dentro de la célula (28). Por medio de estudios genéticos se ha visto que en rotavirus bovino y Rhesus, el producto génico del segmento 4 de RNA es el que sufre este rompimiento específico por tripsina y es además el responsable de la actividad hemaglutinante del virión (16). El rompimiento proteolítico se lleva a cabo en un sitio que no afecta la actividad hemaglutinante. Se han aislado anticuerpos monoclonales contra esta proteína y éstos son capaces de inhibir la hemaglutinación y algunos también de neutralizar al virus (31).

El polipéptido VP7 es una glicoproteína con cadenas glicósídicas del tipo alta manosa (8,32). Esta codificado, en SAll, por el segmento 9 de RNA y es el principal responsable de inducción y unión de anticuerpos neutralizantes (31). Esta glicoproteína muestra heterogeneidad en su migración electroforética por mutación en el gene que la codifica, y se han aislado virus de placas de lisis independientes que presentan fenotipos con migraciones electroforéticas de VP7 diferentes (33).

La biosíntesis de muchas glicoproteínas virales y celulares incluyen la utilización de una extensión de 15 a 30 aminoácidos en la región NH₂-terminal, la secuencia señal. Estas proteínas interactúan con el retículo endoplásmico a través de la secuencia

señal y son vectorialmente descargadas a través de la membrana o se quedan como parte integral de esta. La mayoría de los péptidos señal se cortan de la cadena polipeptídica naciente por una peptidasa señal, aunque algunas glicoproteínas contienen secuencias señal integrales que no se rompen de la cadena polipeptídica naciente (34,35,36,37).

El análisis de la síntesis de VP7 in vivo e in vitro indican que esta proteína contiene una secuencia señal de 1500 daltones que se rompe, y la proteína se encuentra totalmente insertada en el lumen del retículo endoplásmico (38). La secuencia del gene que codifica para esta glicoproteína ha mostrado la presencia de dos regiones hidrofóbicas cerca de la región NH₂-terminal y un solo sitio potencial de glicosilación (39).

En extractos de células infectadas se han encontrado, además de los cinco polipéptidos estructurales del virus, 6 proteínas no estructurales. Una de éstas, denominada NCVP5, es una glicoproteína que contiene dos residuos de oligosacáridos del tipo alta manosa (8,32). La secuencia del gene que codifica para esta glicoproteína ha mostrado que tiene 175 aminoácidos hidrofóbicos en la región NH₂-terminal, con las características de una secuencia señal para translocación en membrana (40). Esta región incluye los dos sitios de glicosilación, lo que indica que la señal líder putativa no se procesa durante la maduración de esta glicoproteína. El análisis de la síntesis de NCVP5 in vivo e in vitro confirman la presencia de una secuencia señal líder que no se rompe, siendo esta proteína, a diferencia de la VP7, una proteína transmembranal del retículo endoplásmico (38).

La replicación de rotavirus in vivo se lleva a cabo en las células epiteliales de las puntas de las vellosidades del intestino delgado, y la infección está localizada primariamente en estas células (41,42).

Los principales cambios visibles en cultivos infectados con rotavirus son vacuolización citoplásmica y la aparición de inclusiones intracitoplásmicas eosinófilas (43,44). La replicación se ha observado en cortes al microscopio electrónico tanto de muestras intestinales como de células en cultivo, infectadas con varias cepas de rotavirus. Se han descrito varias características comunes: partículas virales con un nucleoide denso (25-35 nm), rodeadas por una capa de material menos denso, se concentran en inclusiones citoplásmicas granulares (viroplasma) en la región perinuclear. Estas partículas geman, en áreas libres de ribosomas, hacia el lumen del retículo endoplásmico rugoso, y durante este proceso adquieren una envoltura (45,46,47). El diámetro de las partículas con envoltura varía de 70 a 90 nm. La envoltura se pierde a medida que las partículas se mueven hacia el interior de la cisterna del retículo endoplásmico, y está ausente en viriones puros (62-70 nm) (48,49,50,51).

Siendo los rotavirus los únicos virus conocidos que a pesar de presentar glicoproteínas del tipo N-glicosídico en su superficie no contienen una membrana con lípidos, constituyen un modelo único para el estudio del papel de las glicoproteínas no insertadas en membrana en el ensamble de los virus.

De acuerdo a los datos de la literatura se podría postular el siguiente modelo de maduración (ver Fig.1):

I. Las glicoproteínas VP7 y NCVP5 se sintetizan en membranas del retículo endoplásmico rugoso y la glicosilación de ambas ocurre cotraduccionalmente (38). La VP7, como se mencionó anteriormente, contiene una secuencia señal de 1500 daltones que se rompe durante la translocación a membrana, y aparentemente se encuentra totalmente insertada en el lumen del retículo endoplásmico (38,39). La NCVP5 presenta varias características interesantes: a) solo existe otro ejemplo en la literatura de la presencia de una glicoproteína no estructural para virus sin envoltura, la

proteína E3 de adenovirus (52). b) La NCVP5, junto con la proteína p62 de Sindbis y la neuraminidasa de influenza, son las únicas glicoproteínas de virus animales que contienen una secuencia señal interna que no se procesa (53). c) A diferencia de la VP7, la NCVP5 se comporta como una proteína transmembranal del retículo endoplásmico (38).

II. El resto de las proteínas virales se sintetizan en citoplasma y se acumulan en inclusiones citoplásmicas granulares (viroplama) donde ocurre el ensamble de partículas sub-virales (46,50). La localización de antígenos virales por técnicas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa han comprobado la distribución citoplásmica generalizada de proteínas virales y la presencia de estas en las inclusiones viroplásmicas y en la membrana del retículo endoplásmico (54,55). Estudios ultraestructurales de inmunocitoquímica, en células infectadas con SALL, utilizando anticuerpos mono-específicos, han indicado que mientras que las proteínas de capa interna (VP2 y VP6) se sintetizan en citoplasma y se concentran en inclusiones viroplásmicas; la glicoproteína de capa externa se sintetiza principalmente en ribosomas del retículo endoplásmico (55,56).

III. Los resultados apoyan que la cápside externa se adquiere durante el proceso de gemación al retículo endoplásmico. Dada la localización de NCVP5 es probable que esta actúe como receptor para que las partículas sin capa externa gemen hacia el lumen del retículo endoplásmico.

IV. Durante el proceso de gemación las partículas virales adquieren una envoltura lipídica (50,51). Las partículas con envoltura se han observado al microscopio electrónico en lisados y en homogenados de células infectadas por tinción negativa (51,57). Esta asociación a membrana también se ha visto por cosedimentación de proteínas y partículas virales con membranas celulares (57).

V. Una vez dentro del lumen del retículo endoplásmico la

envoltura lipídica sufre una modificación y esto le permite la transformación en la capa externa del virión.

Los inhibidores de la glicosilación se han empleado para el estudio del papel biológico de las glicoproteínas en varios sistemas (58,59,60). Uno de los inhibidores más utilizados es la tunicamicina. La tunicamicina inhibe la formación de intermediarios N-acetilglucosamina lípido, que actúan como donadores de azúcar en la cadena nascente de la proteína, bloqueando por completo la glicosilación (61,62). La infección con SALL en presencia de tunicamicina ha permitido la observación de los precursores no glicosilados de las proteínas VP7 y NCVP5, y se ha utilizado para estudiar el papel de las dos glicoproteínas en la morfogénesis viral (63,64). La inhibición de la glicosilación de VP7 y NCVP5 previene la formación de la capa externa del virión, pero no la inserción de estas glicoproteínas a membrana (63,64). En estas condiciones, la formación de inclusiones viroplásmicas y la gemación de partículas virales a retículo endoplásmico ocurre normalmente. Sin embargo, en presencia del inhibidor 80% al 100% de las partículas en las cisternas del retículo endoplásmico contienen envoltura, mientras que solo un 10% contienen envoltura en ausencia de tunicamicina. Los resultados son similares si se utiliza una variante de SALL que contiene la proteína VP7 en forma no glicosilada, sugiriendo que, al menos en esta variante, la acumulación de partículas con envoltura y la no aparición de virus maduro no se debe a la falta de glicosilación de VP7 sino de NCVP5 (64).

Este trabajo tuvo por objeto estudiar las etapas tardías en la maduración de los rotavirus. Existen un gran número de estudios que describen la replicación de rotavirus en células en cultivo (48,49,50,51); aunque lo más sobresaliente de la morfogénesis se ha establecido, se conoce poco sobre las últimas etapas,

incluyendo la liberación de partículas virales de la célula infectada. En el presente trabajo se estudió la salida de partículas virales de la célula y se determinó la importancia de las glicoproteínas virales en el proceso de maduración.

MATERIAL Y METODOS:

VIRUS:

El rotavirus de simio SAll adaptado a crecimiento en cultivo de células se obtuvo del Dr. H.H.Malherbe de la Universidad de San Antonio, Texas. Dado que se ha descrito que la glicoproteína estructural del virus puede presentarse en formas de distinto peso molecular (33), en el laboratorio se purificó el virus tres veces por ensayo en placa (33), obteniendo así una clona que presentaba el fenotipo conteniendo la glicoproteína con un peso molecular de 38 000 daltones (M.A. Loroño, datos no publicados).

CULTIVO DE CELULAS:

El rotavirus SAll se creció en una línea de células epiteliales de riñón de mono, MA104. Las células fueron crecidas a 37 C y bajo 5% de CO₂ en Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM) con 100 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 160 µg/ml de gentamicina y 10% de suero bovino fetal como se ha descrito anteriormente (65).

INFECCION:

Las monocapas confluentes de células MA104 en frascos de plástico de 25 cm², se lavaron dos veces con solución amortiguadora fosfatos-salina (PBS: 136 mM NaCl, 2mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1mM KH₂PO₄, 0.9mM CaCl₂ y 0.4mM MgCl₂) y se infectaron con virus SAll. El virus se dejó adsorber durante 1 hr. a 37 C. En todas las preparaciones se utilizó tripsina (Difco 10 µg/ml final) durante el período de adsorción del virus a la célula para aumentar el rendimiento del virus en cultivo (27).

Después del período de adsorción las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con MEM con bajo contenido de metionina (0.3 mg/ml) y se agregaron 100 µCi de metionina-³⁵S

(500 Ci/mmol New England Nuclear Corp.) inmediatamente o a las 4 hrs. post-infección. En algunos experimentos, las células se marcaron durante 30 min. a las 4 hrs. post-infección (pulso) con 500 μ Ci de metionina- $[S]^{35}$ y se lavaron después tres veces con MEM y se incubaron por el período deseado (caza).

En los experimentos en los cuales se agregó tunicamicina esta se añadió en el medio a una concentración de 2.5 μ g/ml durante el período de adsorción, manteniéndola presente durante todo el proceso de infección.

El cultivo de células infectadas fue cosechado a distintos tiempos de infección. Se separó el medio del cultivo celular y la monocapa de células se trató con alguno de los siguientes métodos:

I. TRATAMIENTO CON TRIFLUOROTRICLOROETANO:

Las células se resuspendieron en solución amortiguadora TSM (0.01M Tris-hidroximetilaminoetano, 0.15M NaCl, 0.01M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ pH 8.2) y se trataron con un volumen igual de trifluorotricloroetano (freón). Las partículas presentes en la fase acuosa se centrifugaron una hora a 40 000 rpm en el rotor SW55 de la ultracentrífuga Beckman. El precipitado resultante se resuspendió en 0.2 ml de TSM y se centrifugó en un gradiente continuo de CsCl (1.3 g/cm^3 - 1.4 g/cm^3) en solución amortiguadora TM (0.01M Tris, 0.001M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ pH 8.2) a 36 000 rpm durante 3 hrs. en el rotor SW40 de la ultracentrífuga Beckman. Después de la centrifugación se recolectó el gradiente y se determinó la radiactividad incorporada en una alícuota de cada fracción después de precipitar con ácido tricloroacético al 5%.

II. SEPARACION DE MEMBRANAS:

La monocapa celular se lavó dos veces con PBS sin Ca ni Mg y una vez con solución amortiguadora TE (0.02M Tris, 0.001M EDTA pH 8.2, 1mM PMSF). Las células se resuspendieron en 2 ml de TE y se homogenizaron en un homogenizador Dounce con 25 golpes. El homogenado se centrifugó sobre un gradiente discontinuo de

sacarosa (6 ml 60% - 8 ml 10% en TE) a 12 000 rpm durante 1 hr. en el rotor HB4 de la centrifuga Sorvall. Se colectaron fracciones de 0.2 ml y una alícuota de cada fracción se precipitó con ácido tricloroacético al 5% (TCA) y se determinó la radiactividad incorporada en el material TCA insoluble.

Las fracciones conteniendo material membranar se extrajeron con un volumen igual de freón y se analizó la fase acuosa por la presencia de partículas virales como se describió anteriormente. Las fracciones correspondientes al menisco del gradiente se juntaron y se analizaron también por la presencia de partículas virales.

III. SEPARACION DE CITOSQUELETO:

Las células se lavaron una vez con PBS sin Ca ni Mg y una vez con solución amortiguadora de extracción (BE: 0.01M Tris, pH 7.4, 50mM NaCl, 2.5mM MgCl₂ y 300mM sacarosa). Posteriormente se agregaron 2 ml de BE conteniendo TritonX100 al 1% durante cinco minutos en hielo con agitación suave. Se quitó el sobrenadante conteniendo el material soluble y el material insoluble se resuspendió en BE conteniendo TritonX100 al 1%. Las partículas virales presentes en el material soluble se analizaron por centrifugación en gradientes de CsCl. El material insoluble se trató con un volumen igual de freón y la fase acuosa se analizó por la presencia de partículas virales como se describió anteriormente.

MEDIOS:

Los medios de células infectadas se centrifugaron una hora a 40 000 rpm en el rotor SW55 de la ultracentrifuga Beckman. El precipitado resultante se resuspendió en 0.2 ml de TSM y se analizó por presencia de partículas virales en un gradiente de CsCl como se describió anteriormente.

HEMAGLUTINACION:

Una alícuota (50 ul) de los medios de cultivo y de las células, después de tratarlas con freón, se utilizó para determinar actividad hemaglutinante. Se utilizaron diluciones 1:2 en solución amortiguadora fosfatos-salina pH 7.8, conteniendo albúmina al 0.5%. Las diluciones se incubaron con un volumen igual de eritrocitos humanos del grupo O al 0.5% en PBS con 0.5% de albúmina durante 1 hr. Los títulos se expresan como el recíproco de la máxima dilución positiva por unidad de célula.

ELECTROFORESIS:

Los polipeptidos en las diferentes muestras fueron analizados por electroforesis en gel de acrilamida-SDS de acuerdo al método descrito por Laemmli (66) (30% acrilamida-0.3% bis-acrilamida) utilizando como solución amortiguadora Tris-glicina pH 8.8 conteniendo 0.5M de urea. Las proteínas se disociaron en solución amortiguadora de Laemmli conteniendo 0.5M de urea, tratándolas dos minutos en un baño de agua hirviente.

El gel se corrió a 10 mA en el gel concentrador y a 20 mA hasta que el azul de bromofenol salió del gel separador. Los geles se procesaron para fluorografía de acuerdo al método descrito por Bonner y Laskey (67).

RESULTADOS:

Los distintos estudios sobre replicación de rotavirus en células en cultivo han sugerido la liberación de partículas virales por rompimiento de la membrana plasmática (44,45,46). Una forma preliminar de observar la liberación de partículas virales, es por medio de la hemaglutinación, propiedad asociada a las partículas con capa externa (14,15). En el presente estudio se midió la actividad hemaglutinante, en células infectadas con SAll, a distintos tiempos de la infección. Se observó liberación de hemaglutininas a partir de las 13 hrs. post-infección (alrededor de $2 \cdot 10^3$ UHA/célula), siendo máximo el título a partir de las 16 hrs. post-infección (alrededor de $8 \cdot 10^3$ UHA/célula). A partir de las 15 hrs. post-infección un tercio de la actividad hemaglutinante total es encontrado en el medio del cultivo y dos tercios en las células, éstas últimas medidas después de tratar las células con freón. Este tratamiento es comunmente utilizado para liberar al virus de la célula infectada.

La presencia de actividad hemaglutinante en el medio sugería la presencia de partículas virales con capa externa pero no decía nada acerca de las partículas sin capa externa. Para determinar el tipo de partículas que se liberan de la célula infectada, se analizó tanto el medio como las células por centrifugación en gradientes de CsCl. Este análisis mostró (Fig.2) que solamente el virus con capa externa ($\rho = 1.36 \text{ g/cm}^3$) sale al medio, mientras que, asociadas a las células se encuentran partículas con capa externa así como partículas sin capa externa ($\rho = 1.38 \text{ g/cm}^3$). El tratamiento del medio con freón no cambió la densidad de las partículas encontradas (resultados no mostrados).

La tunicamicina, inhibidor específico de la glicosilación, se ha utilizado para probar la función de un gran número de glicoproteínas virales (58,59,60,61). En rotavirus bovino y en SAll se ha descrito que al inhibir la glicosilación con esta droga

se previene el ensamble de la capa externa del virión (63,64). Para estudiar que efecto tiene el inhibir la glicosilación en la salida de partículas virales de la célula, se llevó a cabo la infección en presencia de tunicamicina. Dada la observación de que solo el virus con capa externa se libera (Fig.2), si en presencia de tunicamicina solo se lleva a cabo el ensamble de partículas sin capa externa, no se esperaría encontrar estas partículas en el medio. Para prevenir por completo la glicosilación se llevó a cabo la infección agregando tunicamicina durante el periodo de adsorción y manteniendola presente durante todo el proceso de infección. El análisis de los medios obtenidos a distintos tiempos de infección mostró, como era esperado, que no hay salida de partículas virales de la célula, y que todo el virus formado (virus sin capa externa) se encuentra asociado a las células (Fig.3).

Para determinar cuál es el tiempo mínimo requerido para que ocurra la glicosilación y el ensamble de partículas con capa externa, se llevó a cabo la infección agregando tunicamicina a distintos tiempos. En la Fig.4 se muestra que el ensamble de partículas con capa externa y la liberación de éstas, es solo parcialmente inhibida si la droga se agrega a las 2 hrs. post-infección. Estos resultados mostraron que si se permitía la síntesis de glicoproteínas en las primeras horas de la infección se posibilitaba la formación de virus con capa externa, sugiriendo que estas glicoproteínas se requieren en cantidades pequeñas para que se complete el proceso de maduración.

Los resultados obtenidos sugerían un mecanismo específico de salida del virus de la célula ya que solo el virus con capa externa o maduro se libera al medio de la célula infectada. Además, inhibiendo la glicosilación se inhibe la formación de virus con capa externa, y como consecuencia también la liberación de partículas virales.

Dada la liberación de partículas virales de la célula se

esperaría encontrar solo las proteínas estructurales del virus en el medio. Sin embargo, al analizar los polipéptidos presentes en el medio se encontró la presencia de un gran número de proteínas virales, tanto estructurales como no estructurales (Fig.5). La salida de éstas proteínas virales podía ser específica, o bien producida por un daño en la membrana plasmática. Si la liberación fuera específica no se esperaría encontrar liberación de proteínas celulares al medio. Para descartar entre estas dos posibilidades se marcaron las proteínas celulares con metionina- $(S)^{35}$ durante dos horas, y después de este periodo se infectaron con SALL. La liberación de una alta proporción de la marca incorporada (Fig.6), sugiere que como resultado de la infección se liberan un gran número de proteínas celulares. Esta salida de proteínas celulares se observa también en ausencia de glicosilación (Fig.6).

Los resultados indicaron que no existe un mecanismo específico de salida del virus de la célula, sino que esta al lisarse libera tanto partículas como proteínas virales y celulares.

A pesar de que se lisan las células como resultado de la infección, todo el virus sin capa externa y un gran número de partículas con capa externa se mantienen asociadas a las células. Esto sugiere que estas partículas virales se mantienen asociadas a estructuras celulares como membranas y/o citoesqueleto y por eso no se liberan al medio.

ASOCIACION A MEMBRANAS:

Las observaciones al microscopio electrónico de células infectadas con rotavirus han sugerido la posible implicación de membranas celulares en la maduración del virus (45,47,50). Durante el proceso de gemación a retículo endoplásmico las partículas virales adquieren una envoltura lipídica, la cual se pierde a medida que las partículas se mueven hacia el interior de la cisterna del retículo endoplásmico. En experimentos llevados

a cabo en el laboratorio se demostró que en homogenados de células infectadas con SAll, analizados por tinción negativa al microscopio electrónico, la mayoría de las partículas virales se encontraban asociadas a membrana (57). Esta asociación también se detectó por cosedimentación de proteínas y partículas virales con membranas celulares.

Con el objeto de ver si el virus intracelular se encuentra asociado a membrana, y por eso no sale de la célula infectada al final de la infección, cuando se ha liberado una gran cantidad de proteínas celulares, se infectaron células con SAll y se marcaron con metionina- $(S)^{35}$. A las 18 hrs. post-infección se separó el medio y las células se homogenizaron. El homogenado se separó en un gradiente discontinuo de sacarosa (60%-10%) por centrifugación a baja velocidad. En estas condiciones las proteínas se recuperan en dos componentes: un material membranar que queda en la interfase del gradiente, y una fracción soluble en el menisco del gradiente (Fig. 7 A). Ambas fracciones se analizaron por la presencia de partículas virales, encontrándose partículas solo en la fracción de membranas, después de extraer éstas con freón (Fig. 7 B).

Estos resultados mostraron que todo el virus intracelular se encuentra asociado a membranas, lo cual va de acuerdo con los datos de la literatura que indican que el proceso de maduración viral ocurre en las membranas y en el lumen del retículo endoplásmico (45,46,47,49).

ASOCIACION A CITOESQUELETO:

Se ha sugerido que el citoesqueleto juega un papel importante en la replicación y ensamble de algunos virus (69,70,71). Experimentalmente el citoesqueleto se ha definido como una serie de proteínas interconectadas que permanece después de la extracción de células con un detergente no iónico (70). Estos detergentes solubilizan lípidos y proteínas asociadas a lípidos, y dejan un

residuo que consiste de filamentos de actina, microtubulos y filamentos intermedios (72,73,74).

Para explorar la posible interacción de las partículas intracelulares con el citoesqueleto, además de la observada a membranas, las células infectadas se lisaron utilizando Tritón X100. En estas condiciones se ha descrito que la mayoría de los fosfolípidos y dos tercios de las proteínas celulares se liberan al medio de extracción (74). Para ver la eficiencia de la extracción, las proteínas celulares extraídas con el detergente y aquellas que permanecen en citoesqueleto se analizaron por electroforésis en gel de acrilamida-SDS (Fig 8). Las proteínas extraídas son similares en células no infectadas exceptuando la ausencia de algunas proteínas virales.

Posteriormente se analizaron las partículas virales presentes en la fracción soluble en Tritón y en el citoesqueleto, por centrifugación en gradiente de CsCl. Este análisis mostró (Fig. 9) que en la fracción soluble se encuentran preferencialmente las partículas con capa externa, mientras que en citoesqueleto permanecen preferencialmente asociadas las partículas sin capa externa. La composición proteica de las partículas separadas (Fig 10), confirmó que éstas corresponden a partículas virales con y sin capa externa como había sido interpretado por la densidad buoyante observada de estas partículas en gradientes de CsCl. La asociación de las partículas virales a citoesqueleto es estable y no se destruye por homogenización, sonicación o al realizar una serie de centrifugaciones diferenciales (resultados no mostrados).

La solubilización de partículas con Tritón sugiere que éstas se encuentran asociadas a membrana. La asociación de partículas a citoesqueleto sugiere que éste juega algún papel en el ensamble del virus, además del papel de las membranas, tal vez actuando como elemento estabilizador en el sitio de ensamble, o bien, dirigiendo

a las partículas virales hacia el sitio de ensamble.

Al analizar las proteínas virales presentes en el medio de cultivo, en la fracción soluble en Tritón X100 y en el citoesqueleto, se encontró que mientras que las glicoproteínas VP7 y NCVP5 se liberan al medio, sus precursores no glicosilados no salen y permanecen asociados a la célula, tanto a la fracción soluble como al citoesqueleto (Fig.11).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

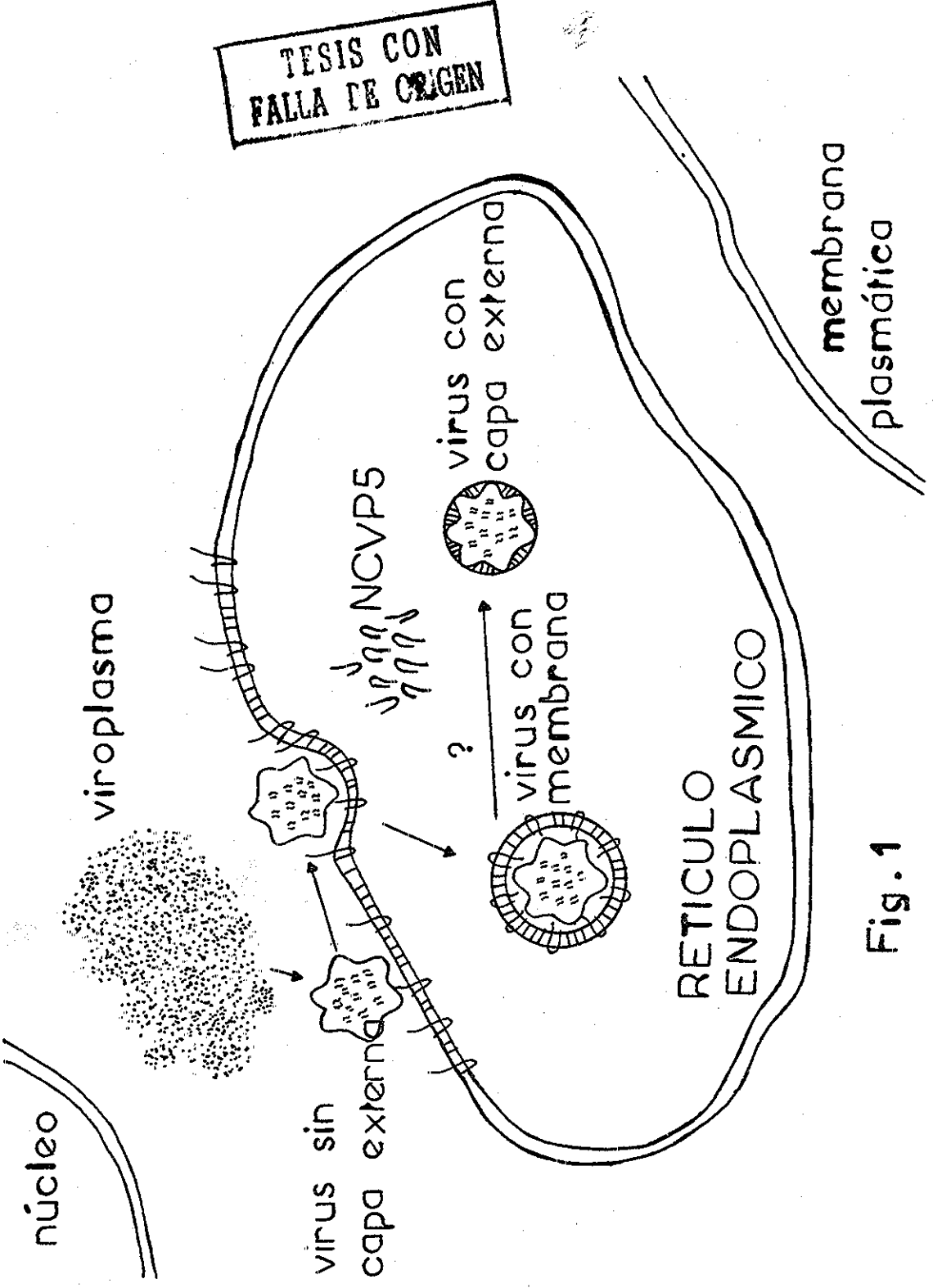


Fig. 1

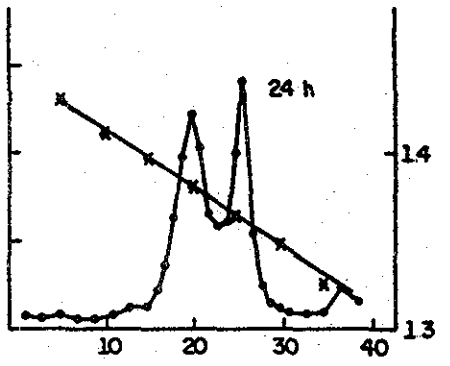
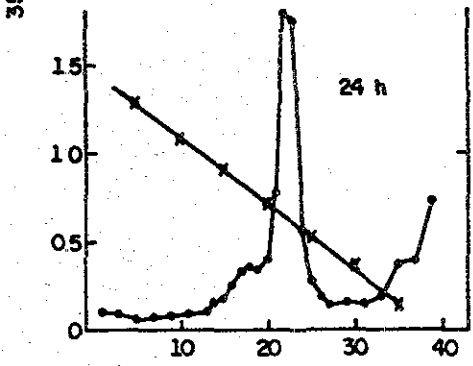
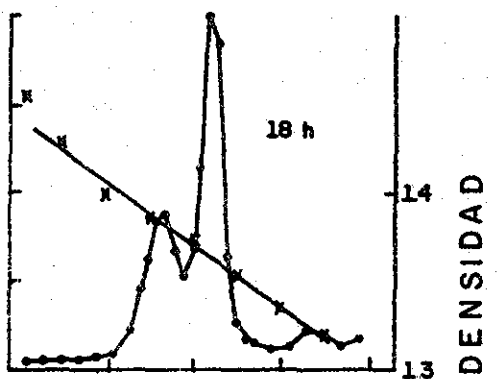
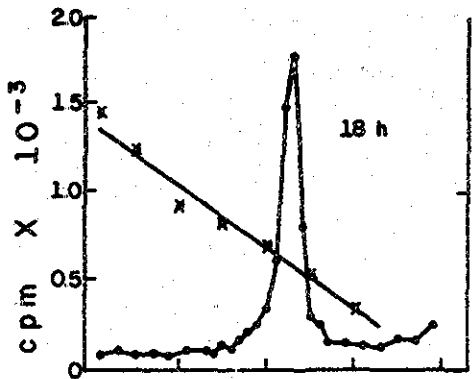
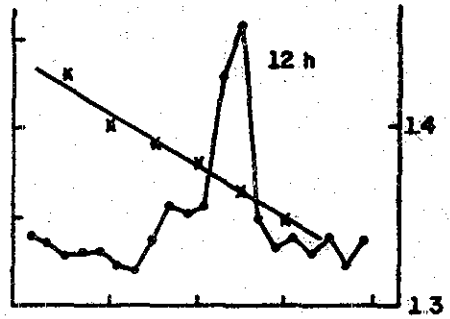
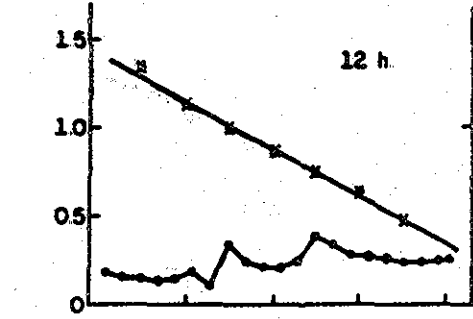
Fig. 2 Partículas virales presentes en el medio y asociadas a la célula en células infectadas con SAll.

Monocapas de células MAL04 se infectaron con SAll. El virus se dejó adsorber durante 1 hr. a 37°C. Después de este período se marcaron con ^{35}S -metionina. El medio de cultivo se separó, utilizando cultivos independientes, a distintos tiempos de infección (12, 18 y 24 hrs.). Las células se resuspendieron en TSM y se trataron con un volumen igual de freón. Las partículas virales presentes en la fase acuosa y en el medio se centrifugaron 1 hr. a 40 000 rpm y el precipitado resultante se analizó en un gradiente preformado de CsCl. Una alícuota de cada fracción se precipitó con TCA al 5% y se midió la radioactividad incorporada en el material TCA insoluble. La densidad se calculó de acuerdo al índice de refracción obtenido en distintas fracciones del gradiente.

- Distribución de ^{35}S -metionina en el gradiente
- * Densidad

LIBERADO

ASOCIADO



N° FRACCION

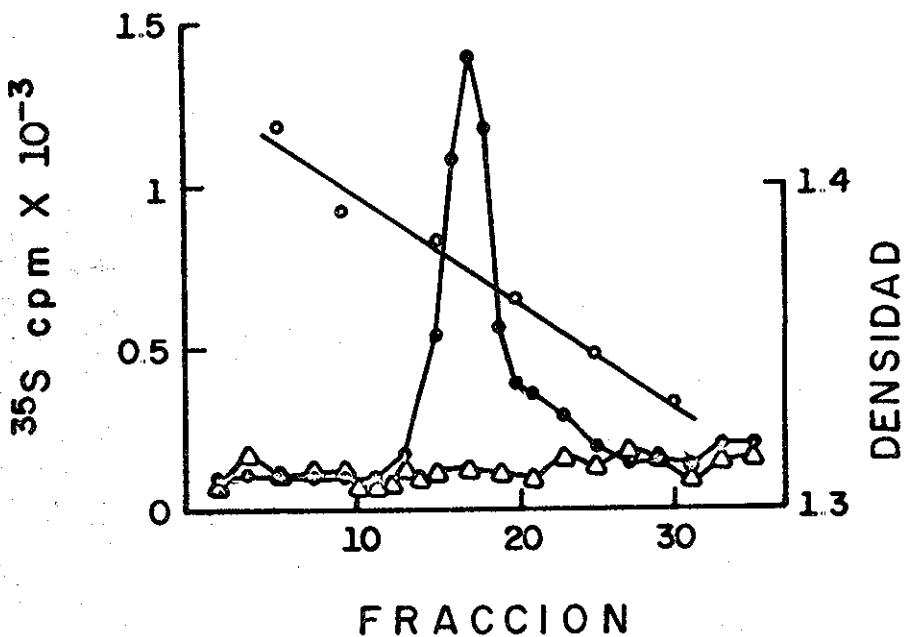


Fig. 3 Partículas virales sintetizadas en presencia de tunicamicina.

Se agregó tunicamicina durante el período de adsorción y se mantuvo presente durante todo el proceso infeccioso. Las células se marcaron con ^3S -metionina después del período de adsorción. A las 24 hrs. post-infección se separó el medio del cultivo. Las células se resuspendieron en TSM y se trataron con un volumen igual de freón. Las partículas virales presentes en la fase acuosa y en el medio de cultivo se analizaron en un gradiente continuo de CsCl . Una alícuota de cada fracción se precipitó con TCA al 5% y se midió la radioactividad incorporada en el material TCA insoluble.

- △ Medio
- Células
- Densidad del gradiente correspondiente a células.

Fig. 4 Partículas virales sintetizadas al agregar tunicamicina a distintos tiempos de infección.

Células infectadas con SAll se marcaron con ^{35}S -metionina después del período de adsorción. En cultivos independientes, la tunicamicina se agregó al medio a distintos tiempos de infección. A las 24 hrs. post-infección se separó el medio del cultivo y las células se resuspendieron en TSM. Las partículas virales presentes en el medio de cultivo y asociadas a la célula se analizaron en un gradiente continuo de CsCl como se describió en la Fig. 2.

- Distribución de ^{35}S -metionina en el gradiente
- ✕ Densidad

Abreviaturas: C- control de células infectadas en ausencia de tunicamicina

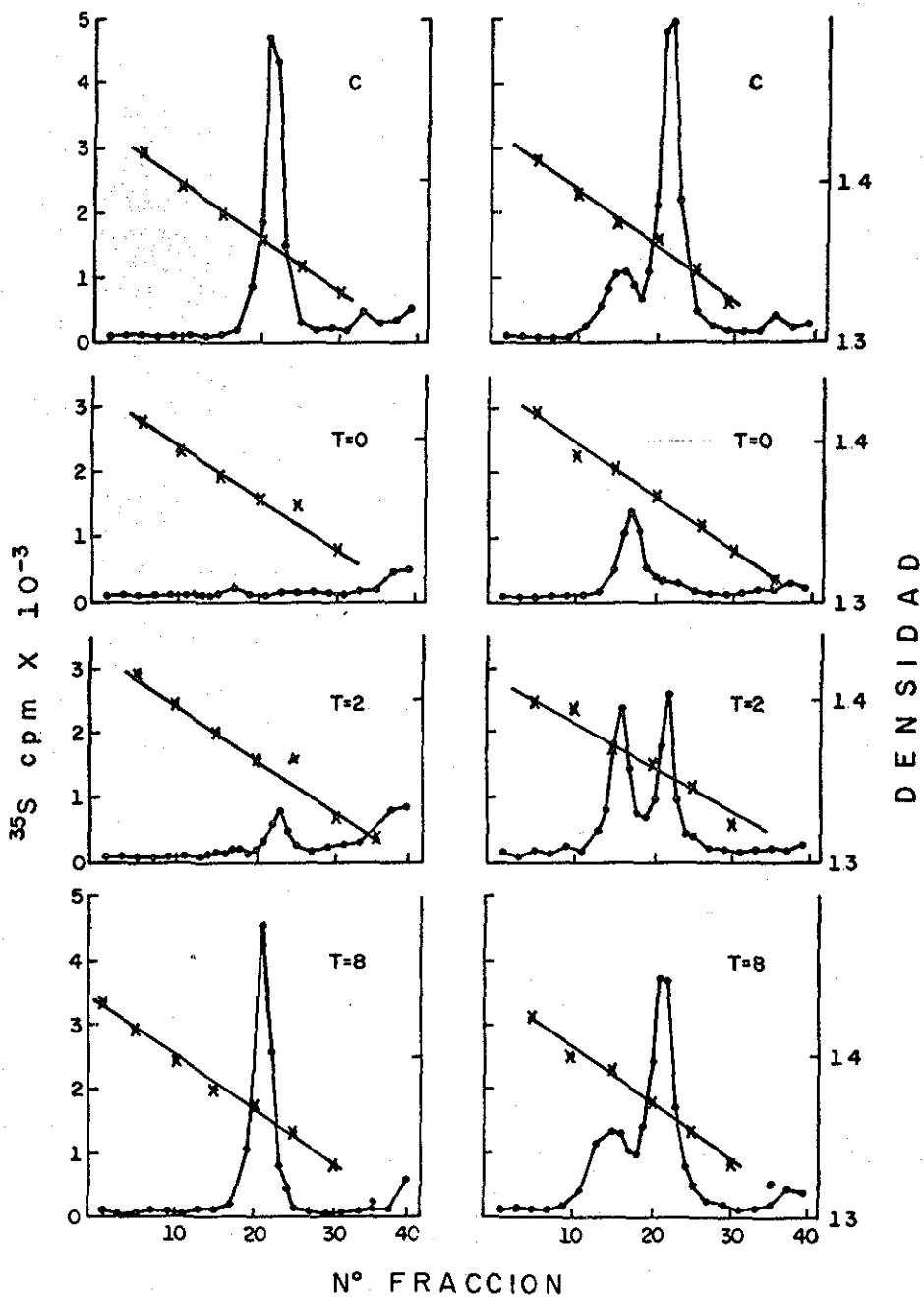
T=0- Tunicamicina agregada desde el período de adsorción

T=2- Tunicamicina agregada a las 2 hrs. post-infección.

T=8- Tunicamicina agregada a las 8 hrs. post-infección.

LIBERADO

ASOCIADO



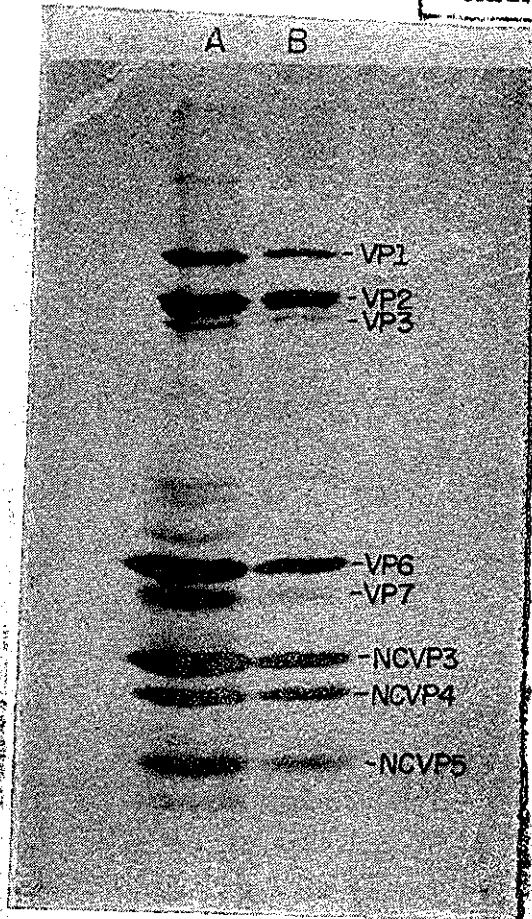


Fig. 5 Fluorografía de un gel de acrilamida-SDS de proteínas virales presentes en el medio de cultivo, marcadas con ^{35}S -metionina.

Células infectadas con SAll se marcaron a las 4 hrs. post-infección con ^{35}S -metionina. Una alícuota del medio de cultivo obtenido a las 12 hrs. (carril B) y a las 15 hrs. (carril A) post-infección se analizó por electroforesis en gel de acrilamida-SDS en presencia de 0.5M urea de acuerdo al método descrito por Laemmli (66).

VP se refiere a proteínas estructurales virales
NCVP se refiere a proteínas no estructurales virales

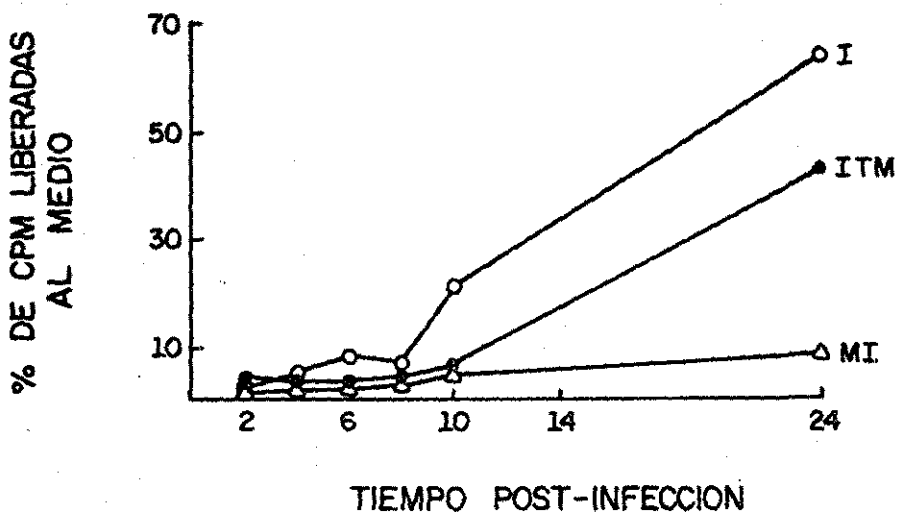


Fig. 6 Liberación de proteínas celulares en células infectadas con Sall.

Monocapas de células MA104 se marcaron durante 2 hrs. con ^3H -metionina. Después de este período se infectaron con Sall y a uno de los cultivos se le agregó tunicamicina durante el período de adsorción y de infección. A distintos tiempos de la infección se tomaron alícuotas del medio de cultivo y se midió la radioactividad incorporada después de precipitar con ácido tricloroacético al 5%.

Abreviaturas; I células infectadas ITM células infectadas en presencia de tunicamicina MI células no infectadas.

Fig. 7 Asociación de partículas virales con membranas celulares

- A) Las células se infectaron con SAll y se marcaron con ^{35}S -metionina durante 30 min. a las 4 hrs. post-infección. A las 18 hrs. post-infección se separó el medio del cultivo y las células se homogenizaron con 25 golpes. El homogenado se centrifugó en un gradiente discontinuo de sacarosa (60% a 10%). A una alícuota de cada fracción del gradiente se le midió la radioactividad incorporada después de precipitar con TCA al 5%.
- B) Las fracciones correspondientes al material membranar del gradiente A) se juntaron y extrajeron con un volumen igual de freón, y la fase acuosa se analizó en un gradiente continuo de CsCl. Una alícuota de cada fracción del gradiente se precipitó con TCA al 5% y se midió la radioactividad incorporada en el material TCA insoluble.
- Distribución de ^{35}S -metionina en el gradiente
 - * Densidad

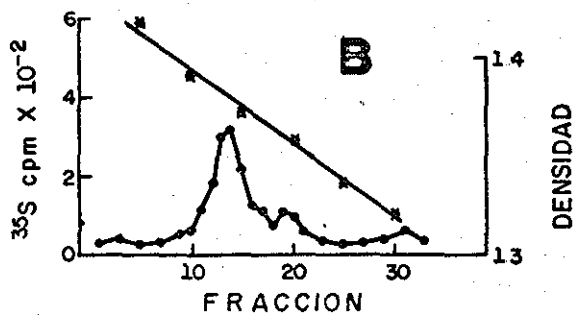
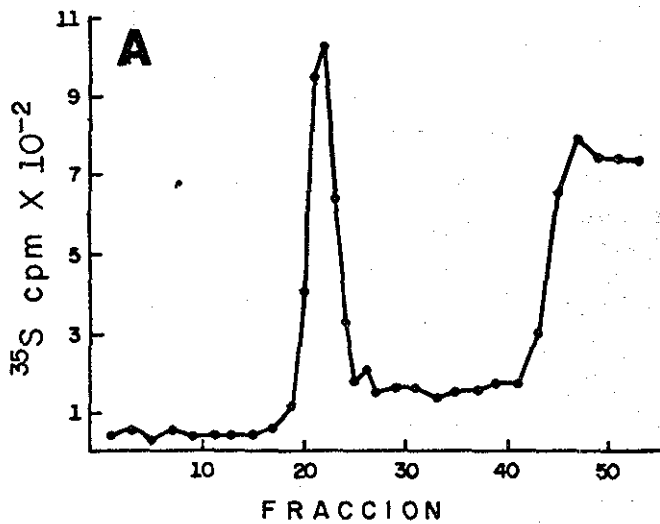


Fig. 7

Fig. 8 Distribución de proteínas entre material soluble e insoluble en Tritón X100.

Las células se infectaron con SAll y se marcaron con ³⁵S-metionina a las 4 hrs. post-infección. A las 15 hrs. post-infección se separó el medio del cultivo y las células se extrajeron con Tritón X100 al 1%. El mismo procedimiento se siguió para un cultivo de células no infectadas. Las proteínas presentes en el material soluble en Tritón y en el insoluble se analizaron por electroforesis en gel de acrilamida-SDS de acuerdo al método descrito por Laemmli (66) y se tiñeron con azul de Coomassie. Como control de proteínas totales se utilizaron células no infectadas lisadas con SDS al 1%.

Abreviaturas: C proteínas totales de células no infectadas

S proteínas solubles en Tritón X100

IS proteínas insolubles en Tritón X100

I células infectadas

NI células no infectadas

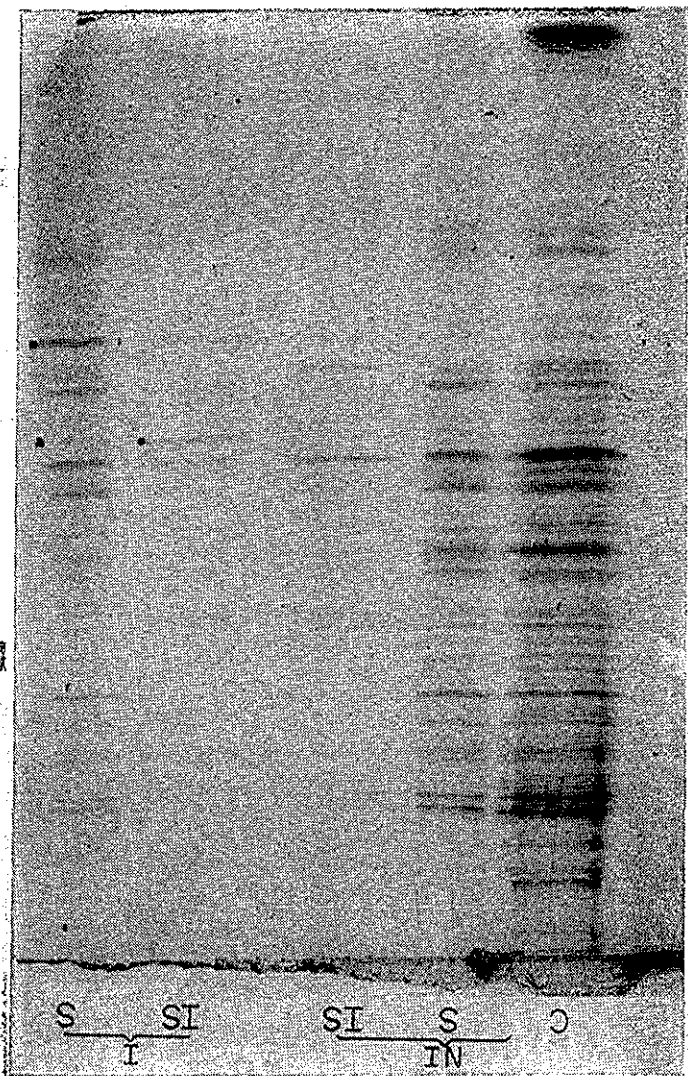


Fig. 8

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

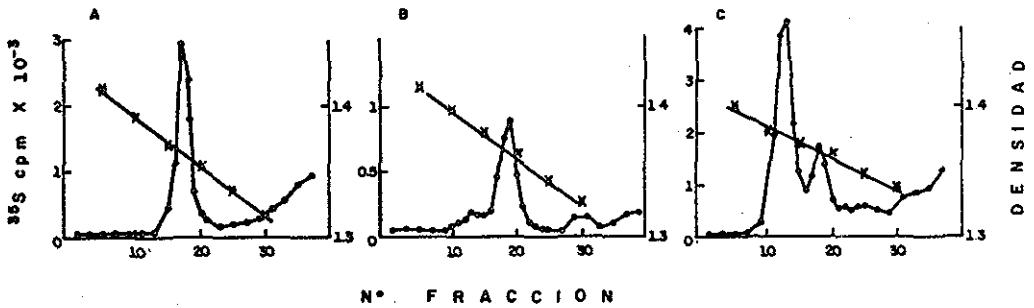


Fig. 9 Asociación de partículas virales con el citoesqueleto

Las células se infectaron con SAll y se marcaron con ^{35}S -metionina a las 4 hrs. post-infección. A las 15 hrs. post-infección se separó el medio de cultivo y las células se rompieron utilizando Tritón X100 al 1% durante 5 min. en hielo. Después de este tiempo se quitó el sobrenadante conteniendo el material soluble y el material insoluble (citoesqueleto) se resuspendió en Tritón X100 al 1%. Las partículas virales presentes en el material soluble se analizaron en un gradiente continuo de CsCl. El material insoluble se trató con un volumen igual de freón y la fase acuosa se analizó por la presencia de partículas virales en gradientes de CsCl.

A. Partículas virales presentes en el medio

B. Partículas virales presentes en la fracción soluble en Tritón X100

C. Partículas virales presentes en la fracción insoluble en Tritón X100.

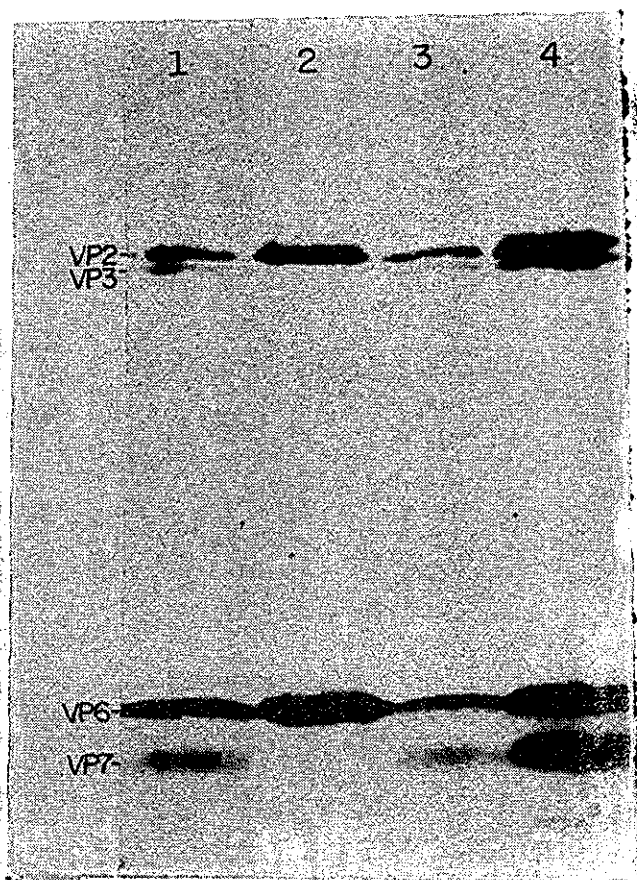


Fig. 10 Fluorografía de un gel de acrilamida-SDS de partículas virales marcadas con ^{35}S -metionina.

Las fracciones de los gradientes de CsCl de la Fig.9 correspondientes a partículas virales se centrifugaron 1 hr. a 40 000 rpm y el precipitado resultante se analizó por electroforesis en gel de acrilamida-SDS de acuerdo al método descrito por Laemmli (66).

- 1. Partículas completas insolubles en Tritón X100
- 2. Partículas sin capa externa insolubles en Tritón X100
- 3. Partículas completas solubles en Tritón X100
- 4. Partículas completas presentes en el medio

Fig. 11 Proteínas virales presentes en la fracción soluble y en la fracción insoluble en Tritón X 100.

Las células se infectaron con SAll y se marcaron con ³⁵S -metionina a las 4 hrs post-infección. A uno de los cultivos se le agregó tunicamicina durante el período de adsorción y de infección. A las 15 hrs post-infección se separó el medio de cultivo y las células se lisaron utilizando triton X 100 al 1 % durante cinco minutos en hielo. Después de este tiempo se quitó el sobrenadante conteniendo el material soluble y el material insoluble se resuspendió en triton X 100 al 1 %. Las proteínas presentes en el medio de cultivo, en la fracción soluble y en la fracción insoluble se analizaron por electroforesis en gel de acrilamida - SDS de acuerdo al metodo descrito por Laemmli (66).

Abreviaturas :

- S. proteínas solubles en triton X 100.
- C. proteínas insolubles en triton X 100.
- M. proteínas del medio.
- MT. proteínas del medio en presencia de tunicamicina.
- CT. proteínas insolubles en triton X 100 en presencia de tunicamicina.
- ST. proteínas solubles en triton X 100 en presencia de tunicamicina.

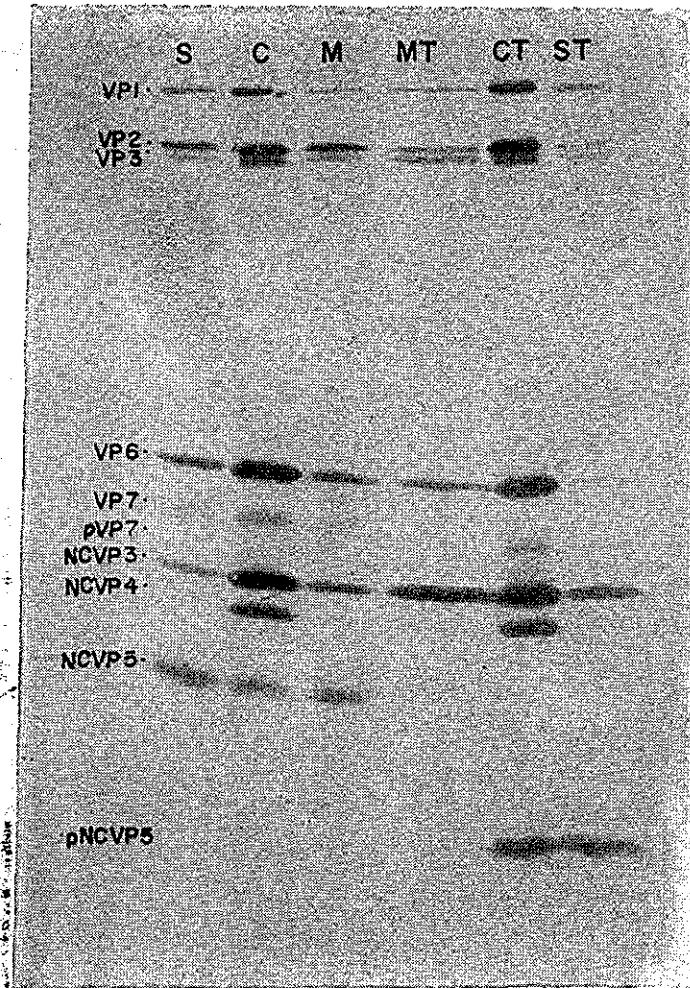


Fig. 11

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSION:

Las glicoproteínas son componentes principales de la membrana externa de los virus con envoltura. Participan en interacciones virales específicas con receptores celulares como adsorción a la célula huésped, hemaglutinación e inducción de fusión celular, y juegan un papel importante en la gemación de viriones en la superficie de la célula infectada (75,76).

Los rotavirus, por ser los únicos virus conocidos sin envoltura lipídica que contienen glicoproteínas con enlaces N-glicosídicos, son un modelo interesante para el estudio del papel de estas glicoproteínas en el ensamble de los virus.

Este estudio tuvo por objeto explorar las últimas etapas en la maduración de los rotavirus y estudiar la importancia de las glicoproteínas virales en este proceso.

Los estudios de replicación de rotavirus en células en cultivo han sugerido la liberación de partículas virales por rompimiento de la membrana plasmática (45,47,50). En el presente trabajo hemos confirmado que como resultado de la infección ocurre un fenómeno de lisis celular. Sin embargo, a pesar de que se lisan las células solo se encuentran partículas con capa externa en el medio.

Como parte del modelo de maduración proponemos que el ensamble de partículas virales se lleva a cabo en la membrana y en el lumen del retículo endoplásmico rugoso, ya que no se encuentran partículas intracelulares libres en el citoplasma.

Una observación que nos parece interesante es el encontrar a la glicoproteína NCVP5 en el medio, a pesar de ser esta una proteína transmembranal (38). Aunque el virión maduro e infeccioso de rotavirus no tiene una envoltura lipídica, ésta se forma transitoriamente durante la gemación del virus al retículo endoplásmico (45,50). Pensamos que esta envoltura contiene la glicoproteína NCVP5, y en el momento que ocurre la transformación de membrana a capa externa, se pierde, junto con la envoltura lipídica, la

NCVP5 y a pesar de ser una proteína transmembranal se libera al medio junto con los viriones maduros por el fenómeno de lisis celular.

En ausencia de glicosilación solo se forman partículas sin capa externa (64). El proceso de maduración se detiene y se acumulan partículas con membrana en el lumen del retículo endoplásmico (64). Los datos indican que la glicosilación es imprescindible para que ocurra la transformación de la membrana a la capa externa del virión. Aunque en ausencia de glicosilación ocurre también el fenómeno de lisis celular no se encuentran partículas virales en el medio y tampoco se observa el precursor no glicosilado de la NCVP5 en el medio, ya que tanto las partículas como el precursor se mantienen asociados a membrana y citoesqueleto.

Hemos encontrado que es suficiente que se permita la glicosilación al inicio de la infección para que ocurra el ensamble de partículas con capa externa, y la síntesis de éstas continúa aún en presencia de la droga. Los resultados sugieren que las glicoproteínas se requieren en cantidades muy pequeñas para que se complete la maduración.

Se ha sugerido que el citoesqueleto, o proteínas asociadas al citoesqueleto, están involucradas en el ensamble y gemación de algunos virus con envoltura. En células infectadas con el virus canine distemper se produce una reorganización de todas las estructuras del citoesqueleto, siendo los cambios más notables en los microtubulos y filamentos intermedios (71). También se ha visto que en retrovirus (R-MuLV) el precursor de la proteína del core Pr65gag, se asocia rápida y específicamente con citoesqueleto (68). Este precursor viral es necesario para el ensamble y gemación de los retrovirus (68). La infección por reovirus, un virus sin envoltura, produce una disrupción y reorganización de filamentos de vimentina. Se piensa que esto ocurre para crear entidades citoplasmáticas que funcionen como sitio de replicación y ensamble

viral (70). Durante el proceso de maduración de rotavirus hemos encontrado también una asociación de partículas virales con citoesqueleto. Se encuentran asociadas preferencialmente las partículas sin capa externa; estas partículas en realidad podrían estar asociadas como partículas con envoltura pero esta última se perdería durante el proceso de extracción con freón, utilizado para desprender las partículas asociadas.

Se conoce poco sobre las interacciones del citoesqueleto con los organelos celulares; pensamos que es muy probable que el retículo endoplásmico así como los demás organelos de la célula se encuentren rodeados por citoesqueleto. Como parte del modelo de maduración de rotavirus proponemos que las inclusiones virales estarían asociadas a citoesqueleto y este posiblemente tendría un papel importante en el transporte de proteínas virales a la membrana del retículo endoplásmico. En la membrana del retículo endoplásmico se ensamblan las partículas sin capa externa y estas geman hacia el lumen del retículo endoplásmico. Durante el proceso de gemación las partículas adquieren una envoltura, estas partículas con envoltura continuarían asociadas a citoesqueleto, tal vez a través de alguna o algunas de las proteínas de la membrana. Aquí el citoesqueleto actuaría probablemente como elemento estabilizador en el sitio de ensamble. Esta interacción con citoesqueleto se rompería cuando la envoltura lipídica se transforma en la capa externa del virión.

Aunque la infección de rotavirus en presencia de citocalasina (inhibidor de la polimerización de actina) y colchicina (inhibidor de la polimerización de tubulina) no afecta el rendimiento del virus en cultivo (C. Soler, M.A. Loroño, comunicación personal), no se descarta la posibilidad de que las partículas se encuentren asociadas a otros elementos del citoesqueleto, como filamentos intermedios. La disponibilidad de pruebas específicas para detectar los distintos componentes del citoesqueleto permitiría llevar a cabo

estudios sobre las interacciones de rotavirus con los distintos sistemas de filamentos y determinar cuáles de estos se alteran y posiblemente se reorganizan durante la infección.

El proceso de gemación del rotavirus al retículo endoplásmico puede ser muy semejante a la gemación de otros virus animales en la membrana plasmática, sin embargo el proceso único para rotavirus y por tanto el más interesante, es la transformación de la envoltura en la capa externa del virión. Para entender mejor este proceso uno de los siguientes pasos a seguir es la purificación de las partículas con envoltura para ver que proteínas se encuentran en esta membrana y que modificación ocurre para que se de la transformación a capa externa.

1. Mc. Nulty, M.S. (1978). Rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 40:1-18.
2. Flewett, T.H. and G.N. Woode. (1978). The Rotaviruses. *Arch. of Virol.* 25: 1-36.
3. Holmes, I.H. (1979). Viral Gastroenteritis. *Prog. Med. Virol.* 25: 1-36.
4. Holmes, I.H. (1983). The Reoviridae. Wolfgang, K., Joklik, K. Ed 359-423. Plenum Publishing Corporation.
5. Espejo, T.R., E. Calderón., N. González., A. Salomón., A. Martuscelli and P. Romero. (1978). Rotavirus gastroenteritis in hospitalized infants and young children in Mexico City. *Rev. Lat Amer. Microbiol.* 20: 239-246.
6. Rodger, S.M., R.D. Schnagl., I.H. Holmes (1975). Biochemical and biophysical characteristics of diarrhoea viruses of human and calf origin. *J. Virol.* 16: 1229-1235.
7. Newman, J.F.E., F. Brown., J.C. Bridger., N. Woode. (1975). Characterization of a rotavirus. *Nature (London)*. 258: 631-633.
8. Arias, C.F., S. López., R.T. Espejo. (1982). Gene protein products of SALL simian rotavirus genome. *Virology*. 41: 42-50.
9. Rodger, S.M., R.D. Schnagl., I.H. Holmes. (1977). Further biochemical characterization including the detection of surface glycoproteins of human, calf and simian rotaviruses. *J. Virol.* 24: 91-98.
10. Elias, M.M. (1977). Separation and infectivity of two particle types of human rotavirus. *J. Gen. Virol.* 37: 191-194.
11. Hruska, J.F., M.F.D. Notter., M.A. Menegus., M.C. Steinhoff. (1978). RNA polymerase associated with human rotaviruses in diarrhoea stools. *J. Virol.* 26: 544-546.
12. Cohen, J. (1977). Ribonucleic acid polymerase activity associated with purified calf rotavirus. *J. Gen Virol.* 36: 395-402.

13. Mason, B.B., D.Y. Graham., M.K. Estes. (1980). In vitro transcription and translation of simian rotavirus Sall gene products. *J. Virol.* 33: 1111-1121.
14. Kalica, A.R., H.D. James., A.Z. Kapikian. (1978). Hemagglutination by simian rotavirus. *J. Clinical Microbiol.* 7: 314-315.
15. Inaba, Y., E.E. Sato., E.E. Takahashi., H. Kurogi., K. Satoda., T. Omori., M. Matumoto. (1977). Hemagglutination with nebraska calf diarrhoea virus. *Microbiology and Immunology.* 21: 531-534.
16. Kalica, A.R., J. Flores., H.B. Greenberg. (1983). Identification of the rotaviral gene that codes for hemagglutination and protease enhanced plaque formation. *Virology.* 125: 194-205.
17. Woode, G.N., J.C. Bridger., J.M. Jones., T.N. Flewett., A.S. Bryden., H.A. Davies., G.B.B. White. (1976). Morphological and antigenic relationships between viruses (rotaviruses) from acute gastroenteritis of children, calves, piglets, mice and foals. *Infect. Imm.* 14: 804-810.
18. Flewett, T.H., A.J. Bryden., H. Davies., G.N. Woode., S.C. Bridger and J.M. Derrick. (1974). Reaction between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* ii 61-63.
19. Schoub, B.D., G. Lecatsas., O.W., Prozesky. (1977). Antigenic relationships between human and simian rotaviruses. *J. Med. Microbiol.* 10: 1-6.
20. Yolken, R.H., B. Barbour., R.G. Wyatt., A.R. Kalica., A.Z. Kapikian., R.M. Chanock. (1978). Enzyme-linked immunosorbent assay for identification of rotaviruses from different animal species. *Science.* 201: 259-261.
21. Thouless, M.E., A.S. Bryden., T.H. Flewett., G.N. Woode., J.C. Bridger., D.R. Snodgrass., J.C. Herring. (1974). Serological relationships between rotaviruses from different species as studied by complement fixation and neutralization. *Arch. Virol.* 53: 287-294.

22. Kalica, A.R., H.B. Greenberg., R.G. Wyatt., J. Flores., M.M. Sereno., A.Z. Kapikian., R.M. Chanock. (1981). Gene of human (strain Wa) and bovine (strain UK) rotaviruses that code for neutralization and subgroup antigens. *Virology*. 112:385-390.

23. Schnagl, R.G., S.M. Rodger., I.H. Holmes. (1981). Variation in human electropherotypes occurring between rotavirus gastroenteritis epidemics in Central Australia. *Infect. Imm.* 33: 17-21.

Kapikian, A.Z., W.L. Cline., H.B. Greenberg., R.G. Wyatt., A.R. Kalica., C.E. Banks., H.D. James., J. Flores., R.M. Chanock. (1981). Antigenic characterization of human and animal rotaviruses by immune adherence hemagglutination assay (IAHA): evidence for distinctness of IAHA and neutralization antigens. *Infect. Imm.* 33: 415-425.

25. Greenberg, H.B., V. Mc. Auliffe., J. Valdesuso., R. Wyatt., J. Flores., A. Kalica., Y. Hoshino., N. Singh. (1983). Analysis of the subgroup protein of rotavirus using monoclonal antibodies. *Infect. Imm.* 39: 91-99.

26. Espejo, T.R., L.F. Avendaño., O. Muñoz., P. Romero. (1980). Comparison of human rotaviruses isolated in Mexico City and in Santiago Chile by electrophoretic migration of their double stranded ribonucleic acid genome segments. *Infect. Imm.* 30: 342-348.

27. Espejo, T.R., S. López., C. Arias. (1981). Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37: 156-160.

28. Clark, S.M., J.R. Roth., M.L. Clark., B.B. Barnett., R.S. Spendlove. (1981). Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. *J. Virol.* 39: 816-822.

Estes, M.K., D.Y. Graham., B.B. Mason. (1981). Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J. Virol.* 39: 879-888.

30. Sonza, S., A.M. Breskin., I.H. Holmes. (1983). Derivation of neutralizing monoclonal antibodies against rotavirus. *J. Virol.* 45: 1143-1146.

32. Ericson, B.L., D.Y. Graham., B.B. Mason., M.K. Estes. (1982). Identification synthesis and modifications of simian rotavirus SALL polypeptides in infected cells. *J. Virol.* 42: 825-839.
33. Estes, M.K., D.Y. Graham., R.F. Ramig., B.L. Ericson. (1982). Heterogeneity in the structural glycoprotein (VP7) of simian rotavirus SALL. *Virology.* 122: 8-14.
34. Wickmer, W. (1980). Assembly of proteins into membranes. *Science* 210: 861-869.
35. Sabatini, D.D., G. Kreibich., T. Morimoto., M. Adesnik. (1982). Mechanisms for the incorporation of proteins in membranes and organelles. *J. Cell. Biol.* 92: 1-22.
36. Braell, W.A., H.F. Lodish. (1982). The erythrocyte anion transport protein is cotranslationally inserted in microsomes. *Cell.* 28:23-31.
37. Braell, W.A., H.F. Lodish. (1982). Ovalbumin utilizes an NH₂-terminal signal sequence. *J. Biol. Chem.* 257: 4578-4582.
38. Ericson, B.L., D.Y. Graham., B.B. Mason., H.H. Hansen., M.K. Estes. (1983). Two types of glycoprotein precursors are produced by the simian rotavirus SALL. 127: 320-332.
39. Arias, C.F., S.López., J.R. Bell., J.H. Strauss. (1984). Primary structure of the neutralization antigen of simian rotavirus SALL as deduced from cDNA sequence. *J. Virol.* 50:657-661.
40. Both, G.W.; L.T. Siegman., R. Bellamy., P.H. Atkinson. (1983). Coding assignment and nucleotide sequence of simian rotavirus SALL gene segment 10: location of glycosylation sites suggests that the signal peptide is not cleaved. *J. Virol.* 48: 335-339.
41. Mebus, C.A., L.E. Newman., (1977). Scanning electron, light and immunofluorescent microscopy of intestine of gnotobiotic calf infected with reovirus-like agent. *Am. J. Vet. Res.* 38: 553-558.

42. Snodgrass, D.R., K.W. Angus., E.W. Gray. (1977). Rotavirus infection in lambs: pathogenesis and pathology. Arch. Virol. 55: 263-274.
43. Welch, A.B., M.J. Twiehaus. (1973). Cell culture studies of a neonatal calf diarrhoea virus. Canadian J. of Comp. Medicine. 37: 287-294.
44. Mc. Nulty, M.S., G.M. Allan., J.B. Mc. Ferran. (1977). Cell culture studies with a cytopathic bovine rotavirus. Arch. Virol. 54: 201-209.
45. Chasey, D. (1977). Different particle types in tissue culture and intestinal epithelium infected with rotavirus. J. Gen. Virol. 37: 443-451.
46. Estes, M.K., D.Y. Graham., C.P. Gerba., E.M. Smith. (1979). Simian rotavirus SALL replication in cell cultures. J. Virol. 31: 810-815.
47. Petrie, B.L., D.Y. Graham., M.K. Estes. (1981). Identification of rotavirus particle types. Intervirology. 16: 20-28.
48. Clark, S.M., R.S. Spendlove., B.B. Barnett. (1980). Role of two particle types in bovine rotavirus morphogenesis. J. Virol. 34: 272-276.
49. Mc. Nulty, M.S., W.L. Curran., J.B. Mc. Ferran. (1976). The morphogenesis of a cytopathic bovine rotavirus in Madin Darby Kidney cells. J. Gen. Virol. 33: 503-508.
50. Altenburg, B.L., D.Y. Graham., M.K. Estes. (1980). Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells. J. Gen. Virol. 46: 75-85.
51. Holmes, I.H., R.F. Bishop., G.P. Davidson. (1975). Infantile enteritis viruses: morphogenesis and morphology. J. Virol. 16: 937-943.
52. Persson, H., Jornvali, H., J. Zabielski. (1980). Multiple mRNA species for the precursor to an adenovirus-encoded glycoprotein: identification and structure of the signal sequence. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77: 6349-6353.

53. Bell, J.R., C.M. Rice., M.W. Hunkapiller., J.H. Strauss. (1982). The N-terminus of PE2 in Sindbis virus infected cells. *Virology*. 119: 255-267.
54. Chasey, D. (1980). Investigation of immunoperoxidase labeled rotavirus in tissue culture by light and electron microscopy. *J. Gen. Virol.* 50: 195-200.
55. Petrie, B.L., D.Y. Graham., H. Hansen., M.K. Estes. (1982). Localization of rotavirus antigens in infected cells by ultrastructural immunocitochemistry. *J. Gen. Virol.* 63: 457-467.
56. Altenburg, B.C., D.Y. Graham., M.K. Estes. (1979). p-41-42. Ultrastructural immunocitochemistry of rotavirus infected cells. In *Proceedings of the Electron Microscopy Society of America. 37th annual meeting.* Electron Microscopy Society of America, San Antonio Texas.
57. Soler, C., C. Musalem., M. Loroño., R.T. Espejo. (1982). Association of viral particles and viral proteins with membranes in SALL infected cells. *J. Virol.* 44: 983-992.
58. Gibson, R., R. Leavitt., S. Kornfeld., S. Schlesinger. (1978). Synthesis and infectivity of vesicular stomatitis virus containing nonglycosylated G protein. *Cell*. 13: 671-679.
59. Nakamura, K., R.W. Compans. (1978). Effects of glucosamine, 2-deoxyglucose and tunicamycin on glycosylation and assembly of influenza viral proteins. *Virology*. 84: 303-319.
60. Schwarz, R.T., J.M. Rohrschneider., F.G. Schmidt. (1976). Suppression of glycoprotein formation of Semliki Forest, Influenza and Avian Sarcoma virus by tunicamycin. *J. Virol.* 19: 782-791.
61. *The Biochemistry of glycoproteins and Proteoglycans.* Edited by William J. Lenarz. (1980). Plenum Press, New York.
62. Takatsuki, A., K.Y. Arma., G. Tamura. (1971). Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin. *J. Antibiot.* 24: 215-233.

63. Sabara, M., L.A. Babiuk., J. Gilchrist., Y. Misra. (1982). Effect of tunicamycin on rotavirus assembly and infectivity. *J. Virol.* 43: 1082-1090.
64. Petrie, B.L., D.Y. Graham., Estes, M.K. (1983). Effects of tunicamycin on rotavirus morphogenesis and infectivity. *J. Virol.* 46: 270-274.
65. Espejo, R.T., E. Martínez., S. López., O. Muñoz. (1980). Different polypeptide composition of two rotavirus types. *Infect. Immun.* 28: 351-354.
66. Bonner, W.M., Laskey, R.A. (1974). A film detection method for tritium labeled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46: 83-88.
66. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*. 227: 680-685.
68. Edbauer, C.A., R.B. Maso. (1983). Cytoskeleton associated Pr65^{gag} and retrovirus assembly. *Virology*. 130: 415-426.
69. Ben Ze'ev, A., R. Abulafia., S. Bratosin. (1983). Herpes simplex virus and protein transport are associated with the cytoskeleton framework and the nuclear matrix in infected BSC-1 cells. *Virology*. 129: 501-507.
70. Sharpe, A.H., L.B. Chen., B.N. Fields. (1982). The interaction of mammalian reoviruses with the cytoskeleton of monkey kidney CV-1 cells. *Virology*. 120: 399-411.
71. Howard, J.M., B.S. Eckert., L.Y.W. Bourguignon. (1983). Comparison of cytoskeletal organization in canine distemper virus-infected and uninfected cells. *J. Gen. Virol.* 64: 2379-2385.
72. Schliwa, V., J. Eulenever., J. Chloebulinsk., J.G. Izant. (1981). Calcium lability of cytoplasmic microtubules and its modulation by microtubule-associated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 1037-1041.

73. Duerr, A., D. Pallas., F. Solomon. (1981). Molecular analysis of cytoplasmic microtubules in situ: identification of both widespread and specific proteins. *Cell*. 24: 203-211.
74. Ben Ze'ev, A., A. Duerr., F. Solomon., S. Pennam. (1979). The outer boundary of the cytoskeleton: a lamina derived from plasma membrane proteins. *Cell*. 17: 859-865.
75. Mooren, H.N.D., F.A. Prins., P. Herbrink., S.O. Warnar. (1981). Electron microscopic studies on the role of the envelope antigens of R-Mu-LV Ts29 in budding. *Virology* 113: 254-262.
76. Simons, K., H. Garoff. (1980). The budding mechanisms of enveloped animal viruses. *J. Gen. Virol.* 50: 1-21.