

Tesis de Posgrado

Glicoproteínas de envoltura del virus Junin : aislamiento y caracterización

Padula, Paula Julieta

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Padula, Paula Julieta. (1995). Glicoproteínas de envoltura del virus Junin : aislamiento y caracterización. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2751_Padula.pdf

Cita tipo Chicago:

Padula, Paula Julieta. "Glicoproteínas de envoltura del virus Junin : aislamiento y caracterización". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2751_Padula.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis

GLICOPROTEINAS DE ENVOLTURA DEL VIRUS JUNIN:
AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION.

Autor

Paula Julieta Padula

Director de Tesis

Dra. Zulema M. de Martínez Segovia

Lugar de Trabajo

Instituto Nacional de Microbiología "Carlos G. Malbran"

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas
Año 1995

AGRADECIMIENTOS

A mi director, Dra. Zulema M. de Martinez Segovia por iniciarme en el mundo fascinante de los virus

Al Instituto Nacional de Microbiología "Carlos G. Malbrán" por su apoyo para la realización y presentación de esta tesis.

A todos mis compañeros de laboratorio por su colaboración, sus valiosas sugerencias, estímulo, apoyo; y muy especialmente a Cristina, Mariana y Sergio.

A mi familia y a todos mis amigos por su estímulo constante.

A la memoria de mi madre.

A mis hijos.

INDICE

ABREVIATURAS	iii
I INTRODUCCION	1
1. GLICOPROTEINAS	1
1.1 PROTEINAS DE MEMBRANA	1
1.2 VIRUS ENVUELTOS - ESTRUCTURA Y BIOSINTESIS	2
1.3.1 VARIABILIDAD EN LA ESTRUCTURA DE LOS AZUCARES.	7
1.3.2 BIOSINTESIS	8
1.4 GLICOPROTEINAS VIRALES. BIOSINTESIS	8
1.5 MODIFICACION DE LAS GLICOPROTEINAS VIRALES	10
1.6 IMPORTANCIA DE LOS AZUCARES EN LA RESPUESTA INMUNE	18
1.7 AISLAMIENTO Y PROPIEDADES HIDROFOBICAS DE LAS GLICOPROTEINAS VIRALES	20
1.8 PROPIEDADES DE LOS DETERGENTES Y ELECCION DEL METODO DE REMOCION. .	22
1.9 PURIFICACION DE VIRUS ENVUELTOS	25
1.9.1 AISLAMIENTO DE VIRUS DEL FLUIDO DEL CULTIVO CELULAR	26
1.9.2 RUPTURA DE LAS PARTICULAS VIRALES Y SEPARACION DE LOS COMPONENTES DE ENVOLTURA	27
2. ARENAVIRUS	31
2.1 GLICOPROTEINAS	32
2.2 EXPRESION Y PROCESAMIENTO	34
2.3 ENSAMBLADO	38
II. OBJETIVOS	40
III. MATERIALES Y METODOS	42
1 PRODUCTOS QUIMICOS	42
2 MATERIAL RADIOACTIVO	42
3 CULTIVOS CELULARES	43
4 VIRUS	44
4.1 PROPAGACION DE VIRUS	44
4.1.1 OBTENCION DE STOCKS VIRALES.	44
4.1.2 OBTENCION DE FLUIDOS INFECTADOS	45
4.1.3 OBTENCION DE PROTEINAS VIRALES RADIOACTIVAS	45
4.2 TITULACION DE VIRUS EN ANIMALES	46
5 PURIFICACION DE VIRIONES	46
5.1 CONCENTRACION DE VIRUS	46
5.2 PURIFICACION DE VIRUS	47
5.3 ANALISIS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS	48
5.4 CONCENTRACION DE LA MUESTRA	48
6 CARACTERIZACION DE PROTEINAS VIRALES	49
6.1 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	49
6.2 REVELADO DE LAS PROTEINAS	49
6.3 TRANSFERENCIA	50
6.4 INMUNOTRANSFERENCIA	51
6.5 DIGESTION ENZIMATICA	51
7 OBTENCION DE INMUNOSUEROS	52
8 SECUENCIACION DE AMINOACIDOS	52
IV. RESULTADOS	53
1. CARACTERIZACION DE GLICOPROTEINAS	53
1.1 OPTIMIZACION DE LA PRODUCCION VIRAL	53

1.1.1	SUSTRATO CELULAR	54
1.1.2	STOCKS VIRALES	57
1.1.3	METODOS DE CONCENTRACION Y PURIFICACION	58
1.2	ACTIVIDAD INMUNOGENICA DE LAS GLICOPROTEINAS	62
1.2.1	INDICE DE NEUTRALIZACION	64
1.2.2	EFECTO DE PROTECCION A LA DESCARGA CON VIRUS VIVO	66
1.3	CONTENIDO DE AZUCARES. TIPO DE UNION	68
1.3.1	EFECTO DE TM EN LA PRODUCCION DE LA PROGENIE VIRAL	69
1.3.2	EFECTO DE TM EN LA FORMACION DE PARTICULAS VIRALES	69
1.3.3	SINTESIS DE POLIPEPTIDOS VIRALES EN PRESENCIA DE TM	75
2.	AISLAMIENTO DE GLICOPROTEINAS	78
2.1	A PARTIR DE MEMBRANAS DE CELULAS INFECTADAS.	78
2.2	A PARTIR DE CELULAS PERMANENTEMENTE INFECTADAS	83
2.3	A PARTIR DE VIRIONES.	87
2.3.1	RENATURALIZACION DE LOS COMPLEJOS PROTEINA DODECIL SULFATO DE SODIO.	88
2.4	INMUNIZACION DE ANIMALES CON PROTEINAS PURIFICADAS	90
3.	LOCALIZACION GENOMICA DE GP 38	93
3.1	ESTRATEGIA PARA LA OBTENCION DE SECUENCIA AMINOACIDICA PARCIAL DE GP38.	94
3.2	PURIFICACION DE GP38 POR GEL DE PAA-SDS.	95
3.3	DETERMINACION DE LA SECUENCIA N-TERMINAL.	98
3.3.1	RECUPERACION DE PROTEINA SECUENCIABLE.	101
3.3.2	ANALISIS DE LA SECUENCIA INTERNA DE AMINOACIDOS.	103
3.4	DETERMINACION DE LA SECUENCIA N-TERMINAL EN PRESENCIA DE INHIBIDOR DE GLICOSILACION	106
3.5	ANALISIS DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS	113
3.6	BUSQUEDA DE SIMILITUD DE LA SUBSECUENCIA PEPTIDICA	113
3.6.1	ALINEAMIENTO MULTIPLE DE SECUENCIAS	119
3.7	PREDICCION DE SEPARACION DE GP 38-1 DE GP 38-2 POR PUNTO ISOELECTRICO.	129
3.7	CONCLUSIONES	131
4.	CARACTERIZACION TOPOLOGICA	132
4.1	EFECTO DE ENZIMAS PROTEOLITICAS	133
4.2	EFECTO DE AGENTES DE ENTRECruzAMIENTO	139
V.	DISCUSION	142
VI	BIBLIOGRAFIA	155

ABREVIATURAS

°C	grados centígrados.
μCi	micro Curie.
μg	microgramos.
μl	microlitros.
aa	aminoácido.
BSA	seroalbúmina bovina.
cél.	célula.
céls.	células.
Ci	Curie.
cpm	cuentas por minuto.
Da	Dalton.
DI	partículas defectivas interferentes.
DL50	Dosis letal 50%
DNA	ácido desoxirribonucleico.
DO	densidad óptica.
DOC	deoxicolato de sodio.
dpm	desintegraciones por minuto.
DTT	ditiotritol.
EDTA	etilendiaminotetra acetato de sodio.
FHA	Fiebre Hemorrágica Argentina.
fig.	figura.
g	gramo.
h	hora.
h.p.i.	horas post-infección.
hs	horas.
i.c.	intracerebral.
kDa	kiloDalton (1000 Da).
l	litro.
LAS	virus Lassa.

LCM	virus de la Coriomeningitis Linfocítica.
log	logaritmo base 10.
M	molar.
m.d.i.	multiplicidad de infección.
MEM	medio esencial mínimo.
mg	miligramo.
min	minutos.
ml	mililitro.
mM	milimolar.
MOP	virus Mopeia
mRNA	RNA mensajero.
mRNAs	RNAs mensajeros.
pmoles	picomoles.
p/v	peso en volúmen.
PAA	poliacrilamida.
PBS	buffer salino de fosfatos.
p.i.	post infección.
PIC	virus Pichinde.
PM	peso molecular.
PMSF	fluoruro de fenilmetil sulfonilo.
RNA	ácido ribonucleico.
RNAs	ácidos ribonucleicos.
rpm	revoluciones por minuto.
SDS	dodecil sulfato de sodio.
TAC	virus Tacaribe.
TCA	ácido tricloroacético.
TEMED	tetra metil etilendiamina.
Tris	Tris [hidroximetil] aminometano.
VJ	virus Junín.
VSV	virus de la estomatitis vesicular.
xg	aceleración de la gravedad (980 cm/seg ²)

Abreviaturas de aminoácidos

Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamato	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

Nota: en este trabajo se utilizaron términos en inglés, de uso corriente en la literatura científica, cuando estos son de difícil traducción o carecen de un equivalente castellano ampliamente difundido.

INTRODUCCION

I INTRODUCCION

1. GLICOPROTEINAS

1.1 PROTEINAS DE MEMBRANA

Muchas funciones celulares son realizadas por proteínas que están asociadas con las bicapas lipídicas. La superficie de la membrana celular es la estructura clave para la regulación de diversas actividades de la célula como respuesta a los variados estímulos ambientales. En esta regulación, las proteínas de membrana de la superficie celular, son de suma importancia para recibir las señales extracelulares, a través de la unión de antígenos, hormonas, neurotransmisores, lectinas, anticuerpos, células vecinas o virus.

Los receptores u otras proteínas de membrana, transducen información a los sitios intracelulares apropiados, donde, a menudo son inducidas, respuestas bioquímicas específicas incluyendo la participación de proteínas internas de membrana.

Mientras que muchos ligandos, tales como antígenos, hormonas o virus, los cuales en una célula dada inducen reacciones específicas, han sido identificados y caracterizados a nivel molecular; su contraparte en la superficie celular, los receptores, son usualmente entidades indefinidas. Sin embargo, los datos disponibles indican que en muchos casos los recepto-

res de superficie están representados estructuralmente por glicoproteínas.

Los virus envueltos son cada vez más usados como modelos de estudio para entender mejor la biosíntesis y las propiedades de las glicoproteínas de membrana. Estos virus, en contraste con las células, contienen un pequeño número de proteínas de membrana, lo que hace que las glicoproteínas específicas sean relativamente fáciles de aislar de la partícula viral en forma pura. Por ello el sistema viral ha sido ampliamente aplicado al estudio de la biosíntesis y funciones de las glicoproteínas de membrana en general.

1.2 VIRUS ENVUELTOS - ESTRUCTURA Y BIOSINTESIS

El grupo sistemático de virus envueltos es muy heterogéneo. La mayoría de ellos están clasificados como virus animales, a pesar de conocerse virus de plantas o bacterianos.

Estos grupos están a su vez subdivididos de acuerdo a su material genético en virus a RNA o DNA.

Todos ellos son de gran interés como patógenos. Sin embargo sólo unas pocas familias de virus envueltos han sido estudiadas intensivamente, son aquellas en las que sus especies pueden cultivarse para obtener buenos títulos y que son fácilmente purificables con buen rendimiento. Entre éstos están

los Rhabdovirus, Togavirus, Influenza, Parainfluenza y aquellos relacionados al cáncer, los Retrovirus.

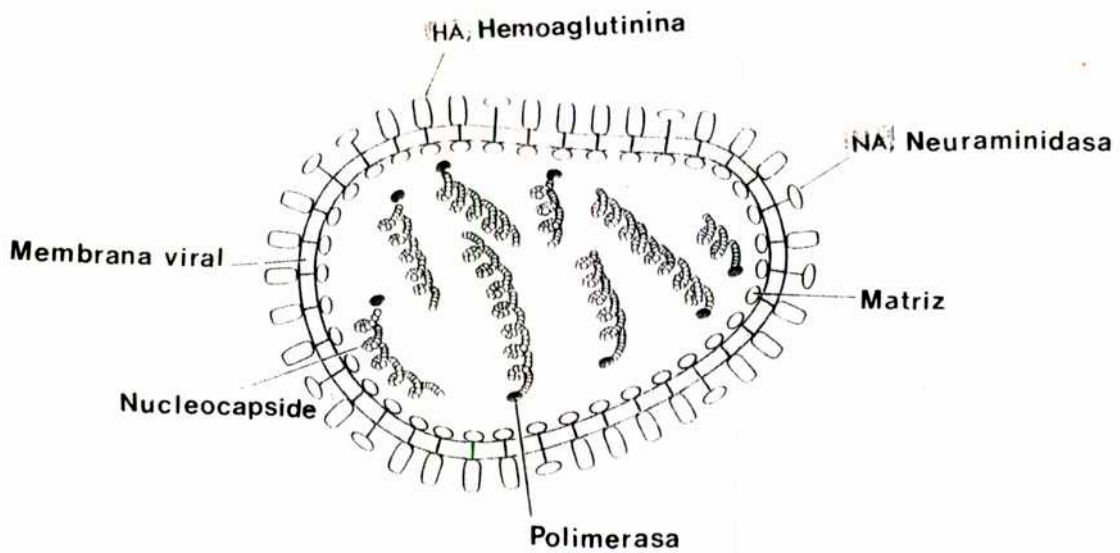
En la figura I.1 se muestra modelos esquemáticos del virus de Semliki Forest (SFV) y el virus de la influenza

Estos esquemas muestran las espículas glicoproteicas específicas asociadas con la bicapa lipídica viral, y en el caso del virus de Influenza la envoltura viral está recubierta en la parte interna por una proteína designada M. Estas dos formas representan los dos prototipos principales para muchos virus a RNA envueltos, a pesar de lo cual las apariencias morfológicas de diferentes especies virales pueden variar considerablemente. Los virus DNA envueltos son mucho más complejos como por ejemplo los virus Pox (Sarov & Joklik, 1972; Ben Porat & Kaplan, 1971) o virus Herpes (Kaplan, 1973).

En la mayoría de los virus envueltos el paso de inducción del ensamblado parece ser la adición de una proteína libre de carbohidratos, ya sea la proteína M, la cual recubre o bordea el interior de la bicapa lipídica, o bien otra proteína estructural del core.

La proteína M no glicosilada o las proteínas del core son sintetizadas en los ribosomas libres mientras que las glicoproteínas de la envoltura viral están sujetas a un procesamiento posterior.

A



B

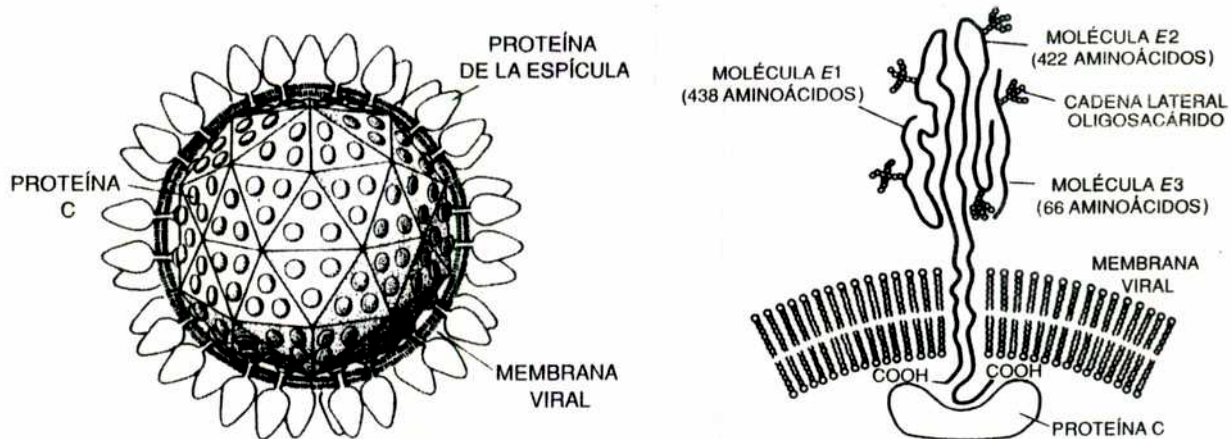


Figura I.1: Modelos esquemáticos de dos virus envueltos.

(Joklik et al., 1994; Palese & Schulman, 1976)

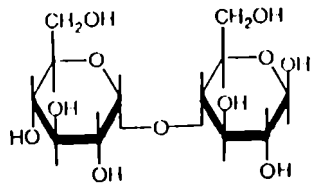
A: virus influenza

B: virus Semliki Forest

1.3 GLICOPROTEINAS

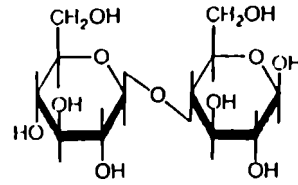
Durante muchos años se realizaron grandes esfuerzos para remover los azúcares "impurezas" de las proteínas o bien las proteínas "impurezas" de los polisacáridos. Pero en las últimas tres décadas se pudo comprobar que los azúcares covalentemente unidos a proteínas, es decir, las glicoproteínas son ubicuos en la naturaleza y se encuentran en todos los organismos vivos con la excepción posible de las bacterias. Se las puede encontrar en la célula en forma soluble o unidas a membrana, así como en la matriz intracelular y en los fluidos extracelulares.

El hecho más distintivo, es la unión péptido-carbohidrato. Se pueden observar cinco tipos de uniones siendo los dos más comunes, la N-glicosídica, unión entre el carbono anomérico de la N-acetilglucosamina (el carbono anomérico puede formar uniones α o β con el azúcar, es decir con el átomo de oxígeno por debajo o por arriba del plano del anillo de azúcar respectivamente (Fig.I.2) y el nitrógeno del grupo amida de la asparagina; y por otro lado las uniones O-glicosídicas entre la N-acetilgalactosamina, galactosa y xilosa con los grupos hidroxilo de la serina, treonina, hidroxilisina e hidroxiprolina. Una glicoproteína puede contener más de un tipo de unión.



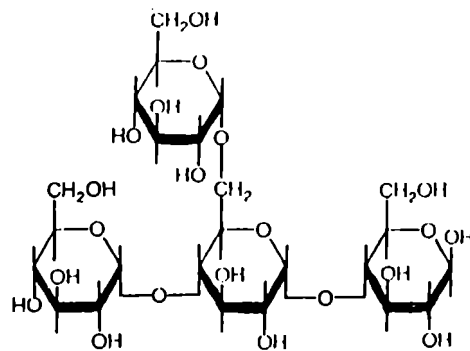
MALTOSA

Unión α



CELOBIOSA

Unión β



Ramificación

Figura I.2: Uniones α o β anoméricas

Dos formas de generar diversidad; no posibles para proteínas o ácidos nucleicos.

1.3.1 VARIABILIDAD EN LA ESTRUCTURA DE LOS AZUCARES.

La síntesis de una proteína dada requiere un número de pasos considerablemente menor que los necesarios para obtener un oligosacárido de tamaño similar. Más interesante que esto es aún la diferencia significativa que hay en el número de oligopéptidos isoméricos u oligosacáridos que se pueden obtener de los correspondientes monómeros.

Una consecuencia importante de esta situación es que hace falta más información analítica para dilucidar la estructura de un oligosacárido que la de un oligopéptido de tamaño comparable.

Justamente el enorme potencial de diversidad estructural, producto de la química del azúcar es muy importante desde el punto de vista biológico, ya que hace de los azúcares excelentes transportadores de información biológica. La información en los heterosacáridos rinde no sólo en la secuencia sino también en la configuración anomérica de las unidades glicosídicas y en la ramificación.

Como resultado, los polímeros de azúcares pueden llevar más información por unidad de peso que las proteínas y los ácidos nucleicos.

1.3.2 BIOSINTESIS

Las cadenas polipeptídicas de las glicoproteínas son sintetizadas de la misma forma que las proteínas sin glicosilar, de tal forma que su estructura está bajo control directo del código genético. Como resultado, todas las moléculas de una dada proteína son idénticas. En contraste, oligo y polisacáridos, ya sean libres o unidos a proteínas, no son productos genéticos primarios. Ellos son sintetizados no enzimáticamente, o, en el caso de los virales por enzimas llamadas glicosiltransferasas, en ausencia de todo templado. Este último tipo de síntesis es menos segura y produce microheterogeneidad en el componente carbohidrato de las glicoproteínas y es justamente esta característica la que provee dificultades especiales en la purificación y caracterización de las glicoproteínas.

1.4 GLICOPROTEINAS VIRALES. BIOSINTESIS

Los sistemas virales son indispensables para el estudio de los rasgos estructurales de las proteínas de la membrana celular, tanto con respecto a los sitios de modificación de la cadena polipeptídica, como con los sitios de clivaje y de glicosilación.

Las glicoproteínas virales son traducidas, como las gli-

coproteínas de membrana, de un RNA mensajero específico, en los ribosomas de membrana.

Este mRNA, además de codificar para la proteína madura, también contiene información para una secuencia de aminoácidos corta e hidrofóbica, llamada secuencia señal, la que en la mayoría de los casos está localizada en el extremo aminoterminal de la proteína respectiva y permite la inserción de la cadena polipeptídica naciente en la membrana del retículo endoplasmático rugoso (RER).

Durante la traducción, el polipéptido es translocado profundamente dentro del lumen del retículo endoplasmático (RE) y la glicosilación primaria comienza con la transferencia de oligosacáridos, del tipo de alto contenido de manosa, desde el intermediario que es el dolicol lipídico (Hemming, 1977; Parodi & Leloir, 1979) a sitios específicos dentro de la secuencia específica del polipéptido. La transferencia del polipéptido naciente a la cisterna del RE, ocurre hasta que una región hidrofóbica cercana al carboxilo terminal se encuentra inserta en la bicapa lipídica, anclando así al polipéptido y exponiendo unos pocos aminoácidos parcialmente básicos y los carboxilos terminales del lado citoplasmático (Ward, 1981).

Las glicoproteínas son luego transportadas a través del RE liso al complejo de Golgi. Durante este transporte intrace-

lular los oligosacáridos de alto contenido en manosa pueden sufrir modificaciones.

Las glicoproteínas virales del complejo de Golgi se transportan a la membrana plasmática, donde usualmente se produce el ensamblado de las partículas de la progenie viral.

1.5 MODIFICACION DE LAS GLICOPROTEINAS VIRALES

Los principales tipos de modificación son a) La adición covalente al polipéptido de otras moléculas diferentes de los aminoácidos y b) El clivaje proteolítico de la cadena polipeptídica en sitios específicos.

Dentro del primer tipo, la modificación más importante es la presencia de carbohidratos en dichas proteínas (Parodi & Leloir, 1979; Olden et al, 1982; Kaplan, 1973). Los oligosacáridos de alto contenido en manosa pueden ser arreglados para producir cadenas de azúcares complejos (Robbins et al., 1977; Kornfeld & Kornfeld, 1980).

Otras moléculas se hallan unidas a los aminoácidos de la cadena polipeptídica de las proteínas como los grupos acetilo, formilo, fosfato o ácido mirístico (Wold, 1981). Sin embargo esta clase de modificaciones son menos comunes en proteínas de membrana que en proteínas citoplasmáticas o nucleares, y en orden de magnitud, menos frecuentes que los carbohidratos uni-

dos covalentemente. En contraste a estas modificaciones la acilación a través de la unión covalente de ácidos grasos a proteínas es muy frecuente en proteínas de membrana.

El significado biológico de la acilación puede ser comparado al de la glicosilación. Las propiedades más importantes de esta modificación podríamos resumirlas en tres puntos:

- 1- Los ácidos grasos están asociados a las proteínas por una unión que es resistente a la extracción con detergentes o extracciones orgánicas con cloroformo, metanol, acetona, hexano, éter y otros solventes. La unión es también resistente a la ebullición con SDS o durante electroforesis en geles de PAA-SDS.
- 2- El clivaje proteolítico o químico no libera ácidos grasos.
- 3- La liberación se realiza con álcalis suaves en agua o metanol y se obtienen ácidos grasos metil-ésteres vía transesterificación.

El ácido graso principal es el palmítico, aunque también se ha encontrado ácido esteárico y oleico. Existe una distribución diferencial de ácidos grasos no sólo entre grupos virales sino también entre las diferentes glicoproteínas en un virus dado por ejemplo: en varias cepas de Influenza sólo la he-moaglutinina (HA) lleva ácidos grasos, mientras que no se detectaron en las neuraminidasas (NA). Algo semejante ocurre con

los paramixovirus: el virus Sendai y tres cepas del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) que difieren en su patogenicidad, llevan ácidos grasos unidos a la proteína F solamente. En cuanto a otros grupos, el virus de la estomatitis vesicular (VSV) contiene ácidos grasos en la proteína G ; La Crosse en G1 y G2; Corona virus en E2 (proteína fusogénica); el virus de Semliki Forest (SFV) y Sindbis en E2 más que en E1, (Schmidt, 1983).

La unión de ácidos grasos ocurre con virus envueltos de grupos taxonómicos totalmente diferentes incluyendo virus a RNA y DNA, ya sean oncogénicos o no. Además la acilación no depende del huésped. Por último es obvio que la acilación está restringida a ciertas especies de las proteínas específicas de un virus dado lo cual indicaría características especiales estructurales o funcionales.

El segundo tipo de modificación de las proteínas de membrana es el clivaje proteolítico de la cadena polipeptídica en sitios específicos. Esta maduración proteolítica está muy extendida y representa un hecho común a las proteínas en general (Reich et al, 1975; Holzer & Heinrich, 1980; Wold , 1981).

El clivaje proteolítico ocurre en diferentes sitios y tiempos durante o después de la traducción de un polipéptido. El clivaje cotraduccional de una señal peptídica común ocurre

en muchas proteínas, secretadas y de membrana, de plantas, animales y virales (Sabatini et al, 1982; Bonatti & Blobel, 1979). Esta proteólisis cotraduccional parecería estar confinada al (RER) mientras que, el clivaje postraduccional podría ocurrir en el RE, el complejo de Golgi, la membrana plasmática o aún extracelularmente (Shapiro & August, 1976; Lazarowitz & Choppin, 1975; Klemenz & Diggelmann, 1979).

Algunas glicoproteínas específicas virales pueden ser clivadas proteolíticamente dando dos o más fragmentos, los cuales, pueden permanecer ligados a través de uniones disulfuro. Para las glicoproteínas virales de algunos virus como Influenza y Rous Sarcoma los sitios proteicos de clivaje están hasta cierto punto definidos, sin embargo muy poco se conoce sobre el tipo de enzimas involucradas.

Las proteinasas juegan un rol clave en la expresión genómica de muchos virus que infectan huéspedes eucariotas. En realidad es excepcional que un virus no requiera un procesamiento proteolítico durante su ciclo de replicación. Normalmente una o más proteinasas son las involucradas y pueden ser de origen viral o provenir del huésped. Las proteinasas del huésped frecuentemente están involucradas en la maduración de las proteínas virales, las que pueden estar asociadas con la envoltura viral. Estas últimas son usualmente proteinasas que

clivan el péptido señal de las proteínas de envoltura virales, iniciando así un camino que concluirá en muchas otras modificaciones postraduccionales. En estos casos, las proteínas virales probablemente sigan el camino secretorio de la célula huésped y son procesadas y modificadas en el RE y aparato de Golgi y localizadas en la membrana citoplasmática. Las glicoproteínas E₁ y E₂ de togavirus son excelentes ejemplos de procesamiento de proteínas virales por proteinasas del huésped que clivan el péptido señal para iniciar el movimiento transitorio a través del RE y del aparato de Golgi donde la miristoilación y la glicosilación tienen lugar.

Generalmente las proteinasas virales llevan a cabo sus funciones en el citoplasma de la célula huésped en etapas tempranas del ciclo de replicación. Sin embargo existen ejemplos en los cuales proteinasas codificadas por el virus son responsables de procesamientos que son etapas de maduración importantes y que ocurren tarde en la formación del virión.

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de las uniones peptídicas. Están clasificadas de acuerdo a su sitio de acción y pueden ser exoproteasas o endoproteasas. Las primeras inician la remoción de aminoácidos (aa) del grupo carboxi o amino terminal de las proteínas y usualmente continúan esta actividad en forma progresiva. Las endoproteasas o

proteinasas clivan uniones peptídicas específicas localizadas entre dos aminoácidos que se encuentran en posiciones internas de la proteína o del polipéptido. Las proteinasas que clivan en dichos sitios pueden en forma simple ser definidas como aquellas que tienen un sitio catalítico y un bolsillo de unión al sustrato muy próximos.

La distribución espacial de los aminoácidos que constituyen el sitio catalítico es conservado en la naturaleza y es lo que provee el principio en el cual se basa la clasificación de las proteinasas.

Han sido propuestas entonces cuatro clases; serina, cisteína (o tiol), aspártico (o ácidas) y metal proteinasas.

El bolsillo de unión al sustrato de una proteinasa es la característica que distingue una dada proteinasa de otras, ya sean virales o celulares. La conservación de los parámetros catalíticos no es extensible al bolsillo de unión al sustrato. Este último es una estructura tridimensional bien diferente entre los miembros de la misma clase de proteinasas (Dougherty & Semler, 1993) y puede tener preferencia por solamente un aminoácido o puede tener un requerimiento absoluto de un sustrato dado, que en algunas instancias, consta de un arreglo lineal de siete aminoácidos de largo. Se ha propuesto una nomenclatura que describe la secuencia del sitio de clivaje y el

bolsillo de unión al sustrato (Schechter & Berger, 1967) (Fig.I.3).

El clivaje proteolítico controlado constituye un mecanismo regulatorio fundamental en una amplia variedad de sistemas biológicos (Neurath & Walsh, 1976). El camino del complemento, la regulación funcional de sistemas efectores como la coagulación de la sangre (Davie & Fujikawa, 1975) son algunos ejemplos de proteólisis controlada. Dentro de los sistemas virales, picornavirus es un modelo de clivaje autoproteolítico donde el producto de la traducción de la poliproteína VP0 es clave en el ciclo replicativo (Butterworth, 1977).

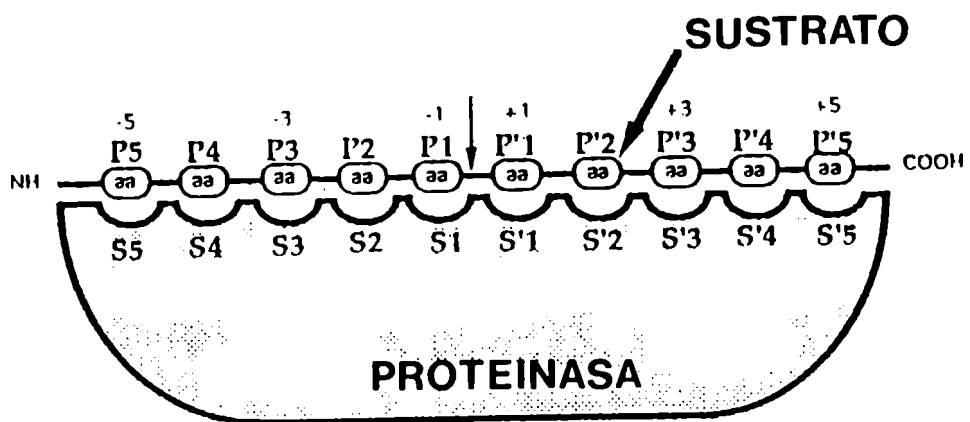


Figura I.3: Representación esquemática de una proteínasa y su sustrato. (Dougherty & Semler, 1993)
 La nomenclatura usada es de Schechter & Berger (1967).

En algunos virus como SFV y el virus de Sindbis el clivaje proteolítico en secuencias de aminoácidos básicos está estudiada (Garoff et al., 1980; Rice & Strauss, 1981). Sin embargo la actividad de proteasa responsable del clivaje de proteínas virales no es aún muy conocida.

1.6 IMPORTANCIA DE LOS AZUCARES EN LA RESPUESTA INMUNE

Para el estudio del requerimiento de carbohidratos en la interacción virus-célula es necesario contar con reactivos que remuevan azúcares de las glicoproteínas evitando la proteólisis o cualquier modificación en la cadena proteica. Por ejemplo la endoglicosidasa F cliva eficientemente tanto los carbohidratos de alto contenido en manosa como los complejos unidos vía asparagina (Elder & Alexander, 1982).

Varios inhibidores de la glicosilación se usaron para identificar glicoproteínas parcialmente glicosiladas tratando de conocer su movimiento intracelular y su función en el virus como en herpes simplex virus (HSV). Las células infectadas en presencia de un azúcar análogo de la manosa, el 2-deoxi-D-glucosa sintetizan formas de la glicoproteína especificada por el virus que están parcialmente glicosiladas. Bajo estas condiciones, los viriones se producen pero no son infectivos. La incorporación de la 2-deoxi-D-glucosa en las formas subglicosiladas de las glicoproteínas, como un sustituto de manosa,

estaría evitando la adición del core completo de manosa, y así, la elongación de la cadena de oligosacáridos (Courtney, 1976).

La tunicamicina, inhibidor de la glicosilación, actúa como análogo de la UDP-N-acetilglucosamina (Pizer et al., 1980), interrumpiendo la glicosilación cotraduccional de la cadena peptídica por interferencia con la formación del intermediario del dolicol pirofosfato-N-acetilglucosamina, el que actúa normalmente como "carrier" para la unión N-glicosídica del core de oligosacáridos a los residuos de asparagina (Struck & Lennarz, 1977).

Otro inhibidor de la glicosilación la benhidrazona causa la acumulación de intermediarios glicoproteicos en células infectadas, con inhibición de las glicoproteínas y la concomitante producción de virus no infecciosos (Campadelli-Fiume et al., 1980).

La monensina, inhibidor de las funciones del sistema de Golgi evita la elongación de la cadena de oligosacáridos, pero no la glicosilación del core asociada al RER (Tartakoff & Vassalli, 1978). Estudios recientes demostraron que la monensina inhibe la liberación de virus Junín infeccioso al espacio extracelular, impidiendo el clivaje del precursor de GPC y

bloqueando la expresión de Gp38 en la superficie de células infectadas (Damonte et al., 1994).

Esta misma glicoproteína fue degradada con enzimas glicosídicas como endo F, α -D- manosidasa y β -D-galactosidasa, con el fin de analizar las cadenas de oligosacáridos unidas al esqueleto proteico (Castilla, 1995).

1.7 AISLAMIENTO Y PROPIEDADES HIDROFOBICAS DE LAS GLICOPROTEINAS VIRALES

Las glicoproteínas virales de membrana pueden aislarse en forma intacta por solubilización de las membranas en detergente. En el primer paso de este proceso el detergente que se une a las membranas causa su ruptura liberando así la nucleocápside (Helenius & Soderlund, 1973).

Los detergentes no iónicos solubilizan las proteínas de membrana por interacción con las partes hidrofóbicas de las proteínas y lípidos. En presencia de un exceso de detergente, cada proteína de membrana y molécula lipídica se inserta en su propia micela de detergente.

Si en la extracción inicial se delipida completamente usando un gran exceso de detergente ej: 11 mg de detergente por mg de proteína y luego se remueve el detergente, los péptidos hidrofóbicos anclados en las glicoproteínas se agregan

unos con otros y forman una micela de proteína. Estas proteínas están usualmente muy agregadas y probablemente permanezcan solubles en agua, aún en ausencia de detergente, por un mecanismo que consiste en internalizar las superficies hidrofóbicas expuestas por medio de autoagregación.

La remoción de detergente no unido puede dejar a la proteína como un complejo de detergente, una vesícula fosfolipídica o una preparación totalmente libre de detergente. En el complejo de proteína-detergente la proteína es un componente minoritario o un componente mayoritario, siendo su solubilidad en agua debida a una capa fina de moléculas de detergente fuertemente unidas. También pueden estar presentes en la micela lípidos. Así dentro de ese entorno hidrofóbico, la conformación nativa de la proteína se mantiene en gran medida, por lo cual este complejo puede ser usado para estudios enzimáticos e inmunológicos así como para analizar las propiedades fisicoquímicas de las proteínas.

Si se remueve el detergente, pero en presencia de lípidos, las vesículas de la bicapa lipídica se reconstituyen con las glicoproteínas insertadas en ellas. Por lo tanto la porción peptídica hidrofóbica de las glicoproteínas nunca se encuentra en la fase acuosa, sí en cambio en la capa hidrofóbica

1.8 PROPIEDADES DE LOS DETERGENTES Y ELECCION DEL METODO DE REMOCION.

Tabla I.1: Algunas propiedades de los detergentes comunmente usados (Furth, 1980).

Nombre común	Descripción química	CMC mg/ml	PM prom	Nro. agreg	BHL
Dodecil Sulfato de sodio SDS	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3^-\text{Na}^+$	2.4	288	62	40
Bromuro de cetil trimetil amonio	$(\text{CH}_3)_3\text{N}^+(\text{C}_{16}\text{H}_{32})\text{Br}$		364	169	
Colato	----	5.7	408	2-4	18
Desoxicolato	----	2.0	392	4-10	16
Triton X-100	monoester de	0.15-0.2	628	140	13.5
Triton N-101	alquilfenil	0.05	642	---	13.4
Lubrol WX	polioxietileno	0.04	93	96	14.9
Tween 80	alquil polioxietileno sorbitol ester	0.013	1300		15.0

lipídica o bien rodeada por la porción hidrofóbica de una molécula de detergente.

La tabla I.1 reseña las propiedades bioquímicas más relevantes de algunos detergentes comunes (Helenius & von-Bonsdorff, 1976; Lee et al., 1979; Weber & Kuter, 1971; Steele & Reynolds, 1979).

Las propiedades más importantes de los detergentes a tener en consideración por su facilidad de remoción son:

A) Concentración micelar crítica (CMC): determina la concentración monómero libre y en consecuencia la facilidad de remoción del detergente, por ejemplo por diálisis.

B) Número de agregación: gobierna el tamaño de la micela y por lo tanto la facilidad de remoción del detergente por técnicas tales como centrifugación por gradiente de densidad de sacarosa o filtración en geles.

C) Balance hidrofílico lipofílico (BHL): es una medida inversa de la hidrofobicidad, relevante en técnicas de adsorción hidrofóbica y en métodos de partición en fases. Esta propiedad deriva de la forma en la que un detergente se distribuye entre las fases polares y no polares. Por ejemplo valores de BHL por arriba de 7 indican una mayor solubilidad en agua que en aceite.

Con respecto a los detergentes no iónicos, los más cono-

cidos derivan del glicerol, la serie de los Tritón, o del sorbitol que es la serie del Tween. Sin embargo las diferentes marcas del mercado tienden a confundir las diferencias o semejanzas químicas entre los distintos detergentes. Nonidet-P40 tiene muy pequeñas diferencias con Triton X100 mientras que la serie de Triton X y la serie de Triton N difieren marcadamente en la ramificación de la cadena alquílica.

En general las variables más importantes son el largo de la cadena y el número de grupos oxietilénicos. Las preparaciones comerciales contienen moléculas que cubren los valores de estas variables en un amplio rango. El comportamiento de los detergentes no iónicos está mayormente gobernado por su bajo valor de CMC característico y su alto número de agregación. Estos dos valores son más temperatura dependientes que para el caso de los detergentes iónicos, particularmente cuando los compuestos contienen menos de 8 grupos oxietilénicos por molécula (Furth, 1980).

Los detergentes iónicos están ejemplificados en la tabla I.1 por las sales biliares, colato y desoxicolato (DOC) y los detergentes llamados desnaturalizantes por el bromuro de trietilamonio y el dodecilsulfato de sodio (SDS). Estos últimos tienden a formar menor número de agregación que los detergentes no iónicos y ambos tienen como característica alto valor

de CMC. Además pueden estar muy influenciados por condiciones externas tales como pH o fuerza iónica, por ejemplo un cambio de fuerza iónica de 0 a 0,2 causa una disminución de 10 veces en el valor de CMC.

Frecuentemente es necesario reemplazar el detergente no iónico que es más adecuado para la extracción inicial, por uno iónico cuyo menor número de agregación permite a la proteína más que al detergente dominar las propiedades de la micela.

1.9 PURIFICACION DE VIRUS ENVUELTOS

La mayor ventaja al usar virus envueltos como modelo para el estudio de membranas y sus componentes en general, es la que proviene del hecho de que la mayoría de estos virus son liberados por el huésped al fluido del cultivo celular, por un proceso de brotación por el cual los componentes virales internos son envueltos. Estos virus pueden ser considerados "paquetes" de ciertas membranas celulares que dependiendo del sitio de brotado representan poblaciones homogéneas de estructuras biológicas funcionales.

1.9.1 AISLAMIENTO DE VIRUS DEL FLUIDO DEL CULTIVO CELULAR

Antes de que el fluido celular sea usado para la concentración de virus los restos celulares se deben eliminar por centrifugación a baja velocidad.

Las técnicas modelo de concentración de virus consisten en precipitación con sales o polietilenglicol, adsorción y elución de eritrocitos o concentración por ultrafiltración. Estos primeros pasos de purificación incluyen centrifugación diferencial y el uso de gradientes de sacarosa, tartrato de potasio o algún otro material con alta viscosidad y baja osmolaridad. La pureza es monitoreada generalmente por titulación de infectividad u otros ensayos específicos sobre las fracciones separadas o también puede ser controlada por microscopía electrónica (tinción negativa) y análisis de los polipépticos virales en geles analíticos.

Las preparaciones de virus envueltos pueden estar contaminadas con proteínas celulares del huésped pero, usualmente esta contaminación no excede del 1 al 2 %. Se pueden encontrar dificultades durante la purificación de algunos virus envueltos como la pérdida de las proteínas de las espículas virales, en los gradientes de sacarosa, tal como ocurre para el virus Herpes (Spear & Roizman, 1972). Para retrovirus es importante evitar las condiciones reducidas durante la purificación, por-

que el clivaje de las uniones disulfuro libera las glicoproteínas de las espículas de la bicapa lipídica (Montelaro & Bolognesi, 1980).

1.9.2 RUPTURA DE LAS PARTICULAS VIRALES Y SEPARACION DE LOS COMPONENTES DE ENVOLTURA

Antes de romper una preparación viral pura para el aislamiento de proteínas o lípidos de la envoltura viral es necesario conocer si las glicoproteínas de membrana se pueden renaturalizar una vez que han sido desnaturalizadas por los procedimientos de aislamiento.

Así, si se pretende el aislamiento de las proteínas de la envoltura viral en su configuración nativa, como se requiere para la investigación de las actividades biológicas, se recomienda, para la ruptura de las partículas, el uso de detergentes suaves no-iónicos.

Entre estos detergentes se encuentran los polioxietileno, alquilfenoles (por ejemplo Nonidet P 40 y Triton X-100), Sorbitan polioxietileno monolaurato (Tween 20), ácidos biliares (deoxicolato) y saponinas (digitoninas).

Los métodos de purificación de glicoproteínas solubilizadas en detergentes incluyen centrifugación en gradientes de sacarosa conteniendo detergente, electroforesis en geles de

poliacrilamida, isoelectroenfocado y afinidad cromatográfica en lectinas ligadas a agarosa.

Para estudios topográficos por procedimientos de entrecruzamiento químico (cross-linking), es importante evitar almacenar las preparaciones virales durante períodos largos. La pérdida de actividad biológica frecuentemente observada, es producto de las alteraciones en la topografía proteica, debidas a almacenaje de 3 días a 4°C o aún a -70°C (Markwell & Fox, 1980).

Sin embargo para el análisis estructural de las proteínas de envoltura, la extracción con detergentes no siempre ha sido óptima, algunos detergentes como el Tritón X-100 o el SDS interfieren con las técnicas para la secuenciación de polipéptidos. Otras técnicas preparativas para el aislamiento de las proteínas de la envoltura viral involucran la digestión proteolítica controlada de las partículas virales, obteniéndose de este modo glicoproteínas desprovistas de los péptidos que las anclan en la bicapa lipídica (Schulze, 1970). El método más aplicado para ruptura de virus es el tratamiento de las partículas con un detergente iónico como el SDS, más el agregado de un agente reductor como 2-mercaptoetanol o ditiotritol para obtener los polipéptidos de las cadenas constituyentes de una espícula dada, con la subsecuente separación de proteínas

estructurales por electroforesis en geles. Se localizan las bandas en el gel, se cortan y eluyen por agitación en buffers volátiles como por ejemplo bicarbonato de amonio 0,1M o por electroelución en salchichas de diálisis. Esta última técnica es muy ventajosa para aislamiento de glicoproteínas de virus, ya que a diferencia de otros métodos de elución la recuperación es excelente y la coelución con material no proteico del gel, como por ejemplo ácido acrílico, es muy baja. Durante la diálisis se debe evitar la agregación y la precipitación de las glicoproteínas. Luego las liofilizaciones repetidas eliminan las sustancias volátiles del buffer y se obtiene así, un material apropiado para estudios de la estructura, como mapeo peptídico, secuenciación de aminoácidos y análisis de oligosacáridos.

Con algunas glicoproteínas se debe evitar el uso de agentes reductores. Por ejemplo las glicoproteínas de coronavirus se agregan bajo condiciones reductoras (Sturman et al, 1980). Una vez que las glicoproteínas virales reaccionaron con SDS usualmente no se encuentran forma adecuada para el estudio de su actividad biológica sin un tratamiento renaturalizante posterior.

Para resolver problemas de solubilidad con glicoproteínas virales de membrana, algunos autores generaron espículas gli-

coproteicas solubles en agua por tratamientos cortos de las partículas virales puras con proteasas. Se libera así de la membrana viral, la porción hidrofílica intacta de la espícula.

Naturalmente estas preparaciones carecen del péptido que atraviesa la bicapa lipídica (Skehel & Waterfield, 1975) y obviamente existe el riesgo de digerir la porción hidrofílica de la glicoproteína.

2. ARENAVIRUS

Los arenavirus están agrupados con fines taxonómicos, en dos categorías: el complejo llamado del viejo mundo (ej: LCM, Lassa, Mozambique) y el complejo Tacaribe o del nuevo mundo (ej: Tacaribe (TAC), Junín, Machupo); clasificación basada en la ubicación geográfica en la que fueron aislados; siendo las reacciones serológicas cruzadas mayores entre miembros de un mismo complejo (Howard & Simpson, 1980; Buchmeier et al., 1981; Weber & Buchmeier, 1988).

Las partículas virales envueltas por una bicapa lipídica que proviene de la célula hospedadora, son esféricas o pleomórficas de 50 a 300 nm de diámetro con proyecciones hacia afuera de la superficie del virión (Lascano & Berría, 1974). En su interior se observan gránulos electrodensos de 20 a 25 nm de diámetro identificados como ribosomas derivados del huésped, y esta característica, fue la que dio nombre a la familia (Rowe et al., 1970). El genoma viral contiene dos segmentos de RNA simple cadena con capacidad de iniciar la transcripción en ambos sentidos (Auperin et al., 1984). Cada uno de los segmentos genómicos, designados L y S, codifican para distintos productos primarios de traducción, los que, en la mayoría de los arenavirus, dan lugar a un total de cinco proteínas estructurales (Veza et al., 1977; Leung et al.,

1977; Harnish et al., 1983). El RNA S contiene dos marcos de lectura abiertos para la proteína de nucleocápside (N) y para el precursor de las glicoproteínas (GPC). El RNA L codifica para la RNA polimerasa RNA dependiente y para la proteína Z. En ambos casos los marcos de lectura abiertos de las proteínas codificadas son opuestos, lo que da la doble polaridad al RNA. En esta estructura casi toda la capacidad codificante está aprovechada, presentando solamente regiones no codificantes en los extremos 3', 5' y en la región intergénica entre N y GPC del RNA S y entre Z y L del RNA L (Romanwsky, 1993).

En cuanto a sus propiedades biológicas, varios de ellos, entre los cuales se incluye el VJ, agente etiológico de la Fiebre Hemorrágica Argentina, son patógenos para el hombre y causan una enfermedad con alta mortalidad. Los Arenavirus producen infecciones persistentes, tanto en roedores que son sus hospedadores naturales, como en cultivos celulares (D'Aiutolo & Coto, 1986; Howard, 1986).

2.1 GLICOPROTEINAS

Para la mayoría de los arenavirus se han identificado dos glicoproteínas designadas GP-1 y GP-2 cuyos PM varían entre 35 a 50kDa; sin embargo para TAC y Tamiami (TAM) se ha descripto solamente una, similar en tamaño a GP-1. Ambas glicoproteínas

son obtenidas de un precursor común GPC de 70 a 75 kDa. Últimamente para TAC se demostró la existencia de 2 GPC de PM 70 y 67 kDa en células infectadas usando suero monoespecífico preparado en bacterias contra la proteína GPC (Iapalucci et al., 1994).

El análisis de la secuencia nucleotídica de clones cDNA, obtenidos por transcripción reversa del RNA viral S, informa dos dominios hidrofóbicos largos, los que pueden estar involucrados en el anclaje de las glicoproteínas en la membrana viral. Uno de los dominios es una secuencia hidrofóbica, cerca del extremo N terminal de GPC, que es ligeramente mayor que el péptido señal de otras glicoproteínas virales, como la neuraminidasa del virus de Influenza o las glicoproteínas de paramixovirus (Nayak & Jabbar, 1989). El segundo dominio hidrofóbico, de 23 residuos, está localizado en el extremo C terminal. La morfología de las glicoproteínas aparenta ser en forma de T (club-shaped), en imágenes por tinción negativa y también se ha descrito una estructura central ahuecada (Murphy & Whitfield, 1975; Vezza et al., 1977).

En viriones parcialmente rotos, se pudo observar por tinción negativa, diferencias de densidad electrónica en las posiciones donde están localizadas las espículas, sugiriendo que éstas, no sólo están embebidas en la bicapa lipídica, sino que

la atraviesan.

Las glicoproteínas virales son sintetizadas en los poli-ribosomas, unidos a membrana en el RER y son transportadas a través del complejo de Golgi, donde los oligosacáridos simples de alto contenido en manosa son procesados para dar cadenas de oligosacáridos complejos (Stephens & Compans, 1988).

Scolaro et al., 1990 realizaron experiencias de mapeo de péptidos que permitirían deducir que la glicoproteína del VJ presenta en sus cepas atenuadas modificaciones estructurales asociadas a la patogenicidad.

Estas glicoproteínas fueron identificadas como los blancos más importantes para la respuesta inmune del huésped, y los análisis serológicos demostraron que los anticuerpos neutralizantes están dirigidos solamente contra ellas (Cresta et al., 1980 ; Buchmeier et al., 1981; Bruns et al., 1983; Howard et al., 1985; Parekh & Buchmeier, 1986; Ruo et al., 1991).

Respecto a la respuesta inmune celular, se identificaron epítopes para los linfocitos T citotóxicos murinos en las glicoproteínas estructurales (Whitton et al, 1988a,b).

2.2 EXPRESION Y PROCESAMIENTO

El precursor glicoproteico GPC está codificado en el segmento S de RNA, en el sentido del mensajero mientras que la

nucleoproteína N es codificada en el S pero en el sentido antimensajero (Harnish et al., 1983; Riviere et al., 1985; Ghiringhelli et al., 1991)

En LCM, el marco de lectura abierto de GPC codifica para 498 aa incluyendo una secuencia señal de 58 aa, siendo el peso molecular aparente de 70 a 80 kDa en su forma glicosilada. El análisis genético de los GPC de LAS, LCM, PIC, TAC y Junín indica que existen entre 8 y 16 sitios potenciales de glicosilación (Auperin et al., 1984, 1986; Franze-Fernández et al., 1987; Southern et al., 1987; Wright et al., 1989).

Con respecto al contenido de azúcares se estimó, para GPC de PIC que hasta un 47% del peso molecular aparente podría ser debido a carbohidratos.

No se ha descrito hasta el momento la fosforilación o la sulfatación de las glicoproteínas de arenavirus.

Para comprobar que GPC utiliza para su procesamiento el camino secretorio celular, se usaron drogas que inhiben, secuencialmente, pasos del procesamiento de los azúcares unidos vía N (Wright et al., 1990). En estos experimentos la inhibición de la glicosilación por tunicamicina resultó en un bloqueo del procesamiento y transporte de las glicoproteínas e impedimento para producir viriones. Otros inhibidores como castantospermina, la cual no inhibe la adición *en bloc* de la

cadena del precursor rica en manosa, permitió el procesamiento, transporte y maduración del virión.

Cuando se trabajó con mutantes termosensibles con defectos en GPC para el virus de Pichinde (Shivarprakash et al 1988) se vió que algunas mutantes sintetizan y acumulan GPC a temperaturas no permisivas, y a pesar de ser la glicosilación normal, no se observó clivaje a GP-1 y GP-2 y translocación a la superficie de las células BHK₂₁ infectadas; mientras que a temperaturas permisivas las glicoproteínas estaban presentes en la superficie celular por lo que se deduce que la mutación no estaría en la zona de clivaje conservada (Buchmeier et al 1987).

Cuando se estudió la cinética de la glicoproteína viral a diferentes m.d.i. para LCM se vió que NP era la primera proteína que se observaba, alrededor de las 6 hs p.i. mientras que la expresión de GPC se detectaba alrededor de las 24 a 48 hs p.i. y a m.d.i. 1.0 (Buchmeier et al, 1978). Resultados similares se obtuvieron para PIC, trabajando a m.d.i. 50, se detectó GPC a las 12 hs p.i. (Harnish et al, 1981) pero no a m.d.i. inferiores. En células infectadas con TAC, GPC fue detectada a las 48 hs y en aumento hasta las 60 hs p.i. (Saleh et al, 1979).

Muchos estudios examinaron el clivaje del precursor gli-

coproteico para arenavirus. Por medio de los pulsos radioactivos se demostró en LCM y PIC que GPC se cliva aproximadamente 75-90 minutos después de su síntesis, dando como resultado dos glicoproteínas estructurales GP-1 y GP-2 (Harnish et al., 1981; Wright et al, 1990). Parecería ser que el clivaje de GPC en LCM sería un proceso en dos etapas (Burns & Buchmeier, 1993). Se vio que para GPC de LCM, TAC y PIC hay una secuencia señal, de 58 aa de largo, la que estaría conservada entre todos los arenavirus. Este péptido señal es clivado en un sitio conservado para la peptidasa señal y removido antes que la glicoproteína sea transportada desde el RE.

El clivaje de GPC ocurre tardíamente en el camino secretorio en el sistema del Golgi (Wright et al., 1990). Usando péptidos sintéticos, se demostró que el segundo sitio de clivaje de GPC, comprende una zona de 9 aa cercana a los residuos dibásicos Arg₂₆₂-Arg₂₆₃ (Buchmeier et al, 1987).

Para TAC y LCM se comprobó por medio de azúcares radioactivos que GPC inicialmente contiene sólo residuos de alta manosa, los que son secuencialmente convertidos a carbohidratos complejos (Buchmeier & Oldstone, 1979; Boersma et al, 1982). Además se pudo determinar para LCM que GP-1 contiene glucosamina, fucosa y galactosa mientras que GP-2 contiene predominantemente glucosamina y fucosa (Wright et al, 1990). Estos

experimentos permitieron concluir que GPC utiliza el camino secretorio celular para el procesamiento de las uniones N-glicosídicas.

En forma similar las glicoproteínas de Tacaribe contienen glucosamina, galactosa y manosa así como ácido siálico terminal (Boersma et al., 1982).

2.3 ENSAMBLADO

Hasta el momento, no existe información para los arnavirus, sobre la interacción molecular entre componentes virales que conduzca al proceso de brotación en la membrana plasmática. La interacción molecular involucrada en el ensamblaje viral parecería ser poco usual.

Se propuso que en la brotación viral estarían involucradas interacciones laterales entre las glicoproteínas virales para formar un dominio en la membrana plasmática, del cual las proteínas celulares estarían excluidas. Las nucleocápsides reconocerían el dominio citoplasmático de las glicoproteínas virales, conduciendo entonces el proceso de brotación. Este dominio podría jugar un papel, en el ensamblado, análogo de la proteína interna de matriz M, que poseen la mayoría de los virus envueltos, en forma similar a lo que ocurre con la glicoproteína E₁ de los coronavirus (Sturman et al., 1980)

Ni la secuencia aminoacídica deducida de las glicoproteínas virales (Bishop & Auperin, 1987) ni el análisis de los viriones tratados con proteasas han sugerido que existan dominios citoplasmáticos resistentes a proteasas (Veza et al 1977; Gard et al 1977). Se podría esperar un arreglo organizado y regular de glicoproteínas, como se observó para algunos bunyaviruses (von Bonsdorff & Patterson, 1975) si interacciones laterales entre las espículas jugaran un papel importante en la brotación del virión.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio permitieron identificar, en los viriones, seis proteínas estructurales, cuatro de ellas glicosiladas, y entre estas últimas dos mayoritarias de 38 y 72kDa (Martínez Segovia & De Mitri, 1977).

Sin embargo el estudio de las proteínas virales ha mostrado dificultad porque los arenavirus incorporan proteínas celulares en los viriones, ya que no inhiben completamente la síntesis de proteínas, y por su característico rendimiento viral bajo, lo que se hace más relevante cuando se intenta trabajar con glicoproteínas

Además para poder caracterizar los componentes de envoltura del virus Junín es esencial el desarrollo de un método preparativo simple de purificación de glicoproteínas y la preparación de un suero monoespecífico contra estas proteínas.

Para este estudio, nuestro objetivo se centró en la o las glicoproteínas de envoltura, con el fin de caracterizar sus propiedades físicas, biológicas y funcionales dentro de la partícula viral, aportando datos que ayuden al conocimiento de las interrelaciones con otras moléculas del virión, ácidos nucleicos o proteínas, unión a los hidratos de carbono, relación espacial de las glicoproteínas en la partícula madura.

El aislamiento de las glicoproteínas del virus Junín en forma pura nos permitirá el estudio de sus funciones biológicas, así como su secuencia aminoacídica, lo que posibilitaría su correlación con la secuencia genómica dentro del precursor glicoproteico y su comparación con los datos aportados por otros investigadores de los otros miembros de la familia.

MATERIALES Y METODOS

III. MATERIALES Y METODOS

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 medios de cultivo de células fueron 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).

2 MATERIAL RADIOACTIVO

El material usado fue de New England Nuclear (NEN) (Boston, EE.UU.) que proveyó [³⁵S]-metionina, [³H] y [¹⁴C] aminoácidos mezcla y [¹⁴C] glucosamina.

El dosaje del material radioactivo se realizó por medio de un contador de centelleo líquido con mezcla de centelleo.

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

3 CULTIVOS CELULARES

- a) Células BHK₂₁: Se trabajó con una línea de células BHK₂₁ clon 13 crecidas en monocapa (fibroblastos de riñón de hamster lactante - *Mesocricetus auratus*) (Stoker & Mc Pherson, 1961). Se la mantuvo por repiques al llegar a saturación total (monocapa celular completa) con medio de Stoker y Mc Pherson (Stoker & Mc Pherson, 1961) suplementado con 10% de caldo triptosa fosfato y 7% de suero de ternera inactivado más el agregado de 50 mg/ml de gentamicina. El mismo medio se utilizó para medio de mantenimiento suplementado con 2% de suero fetal bovino inactivado. Esta línea celular se usó entre los pasajes 30 a 70.
- b) Celulas Vero: Se utilizó una línea de células Vero (fibroplastos de riñón de mono verde africano- *Cercopithecus aethiops*) crecidas en monocapa (Yasumura & Kawatika, 1963). Se la mantuvo por repiques semanales en medio MEM (medio mínimo esencial con sales de Earle y glutamina) suplementado con 5% de suero de ternera inactivado y 50 mg/ml de gentamicina. El mismo medio se utilizó para medio de mantenimiento pero suplementado con 2% de suero fetal bovino inactivado. Esta línea celular se usó entre los pasajes 40 y 150.
- Ambas líneas celulares fueron cultivadas a 37°C en botellas

roller o en frascos Roux.

4 VIRUS

Se utilizó la cepa Mones Cazón 2 (MC2) (Vilches et al., 1965) del virus Junín en su tercero o cuarto pasaje por el cerebro del ratón lactante (MC2 R3 o MC2 R4). El título de los stocks utilizados fue entre 10^8 y 10^9 DL₅₀/ml.

4.1 PROPAGACION DE VIRUS

Se utilizaron ratones lactantes Albani Pertussis de 24 a 48 hs de vida, tanto para la preparación de stocks virales como para las titulaciones.

4.1.1 OBTENCION DE STOCKS VIRALES.

Se inocularon ratones lactantes Albani Pertussis de 24-48hs. de vida, vía i.c. con 0,02ml de dilución 10^{-2} de suspensión de virus MC2R2 al 20% con título entre $5 \cdot 10^6$ y $5 \cdot 10^7$ DL₅₀/ml. A los 8 a 10 días se sacrificaron los animales y se cosecharon los cerebros. Se preparó un homogenato al 20% (P/V) de cerebro de ratón en solución de sales balanceadas Hanks suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado usando una licuadora a 4000 rpm. durante 3 minutos a 4°C. El homogenato se centrifugó a 2000xg durante 30 minutos a 4°C y el sobrena-

dadnte se fraccionó y congeló a -70°C para ser usado como fuente de virus.

4.1.2 OBTENCION DE FLUIDOS INFECTADOS

Monocapas de 24 hs de células BHK21 o Vero crecidas en frascos Roux o Rollers se lavaron con buffer fosfato salino (PBS) y se infectaron con una suspensión de virus al 20% en medio libre de suero a una multiplicidad de infección que varió entre 1 a 5 DL 50/ml./cel en ratón. Luego de un período de adsorción de 2 hs a 37°C , los cultivos fueron lavados 3 veces con PBS y se continuó la incubación a 37°C con medio de mantenimiento.

A partir del tercer día hasta el sexto inclusive, se cosecharon los fluidos de virus y se lavó y cambió el medio de las células diariamente.

4.1.3 OBTENCION DE PROTEINAS VIRALES RADIOACTIVAS

A las 24, 48 o 72 hs post-infección, los cultivos se lavaron 3 veces con PBS y se reemplazó el medio de mantenimiento por medio fresco desprovisto del compuesto radioactivo que se le iba a agregar, conteniendo $1\ \mu\text{Ci/ml}$ de [^{14}C] glucosamina o $1\ \mu\text{Ci}$ de [^{35}S] metionina o el correspondiente a cada caso.

A las 24 y 48 hs. de este marcado el sobrenadante celular se cosechó, se agregó medio frasco depletado y los virus se

concentraron. Los cultivos no se lavaron entre los días de cosecha para evitar dilución de la marca.

4.2 TITULACION DE VIRUS EN ANIMALES

Se inocularon 0,02 ml de diluciones decimales seriadas de virus por vía i.c. en ratones de 24-48 hs. de edad. Se inyectaron en grupos de 5 ratones por cada dilución. Se registró la muerte entre los días 14 a 21 después de la inoculación. El título se calculó por el método de Reed y Muench

5 PURIFICACION DE VIRIONES

5.1 CONCENTRACION DE VIRUS

Los fluidos cosechados diariamente se clarificaron por centrifugación a 4°C a 5.000xg para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se concentró por:

A) Ultracentrifugación a 100.000xg, a 4°C durante 3 hs, el concentrado se resuspendió en buffer ácido bórico 0,05 M, sacarosa 0,029 M pH 7,2 en 1/600 de su volúmen original.

B) Precipitación con polietilenglicol (PEG 600) al 7%, C1Na 2,3% por agitación a 4°C durante toda la noche y centrifugación a 10.000xg 30 minutos para colectar el precipitado, el que fue resuspendido en la misma foma que en A) pero 1/200 de su volúmen original.

C) Filtración molecular. Para volúmenes superiores a 2 litros se utilizó un equipo Pellicon Cassette System con cuatro membranas con una capacidad de retención de 10^6 , obteniéndose un material concentrado unas 50 a 100 veces, el que luego se concentró por ultracentrifugación como en el punto A).

Durante el desarrollo del presente trabajo los fluídos radioactivos se concentraron según A). El virus destinado a la preparación de inmunosueros prescindió de la concentración con PEG- CLNa según B). En resultados se especificará ventajas y desventajas de cada uno de ellos.

5.2 PURIFICACION DE VIRUS

El material concentrado y suspendido se ultrasonicó en un oscilador sónico Raytheon 10 KC durante 2 minutos y se ultracentrifugó a través de un doble colchón de sacarosa 20-50% en buffer borato 0,05 M pH 7,2 en un rotor SW40 Ti o SW41 Ti a 35.000 rpm durante 1 h a 40°C. La interfase visible se cosechó y diluyó en el mismo buffer hasta lograr una concentración de sacarosa no mayor del 15%.

Este virus parcialmente purificado, en algunos casos, se sometió a un gradiente continuo de sacarosa 15-60%, en el mismo buffer, y se corrió en las mismas condiciones que anteriormente. El gradiente se colectó por punción del fondo del

tubo en alícuotas de 1 ml aproximadamente, salvo especificación.

5.3 ANALISIS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS

A) Espectrofotométricamente por diferencia de la absorbancia a 235 y 280 nm según (Whitaker & Granum, 1980).

Concentración proteica (mg/ml) - (Absorbancia 235-Absorb.280)

 2,51

Este método se utilizó para virus no radioactivo.

B) Por determinación de la radioactividad asociada:

(1) Directamente: se leyeron alícuotas de cada fracción en un contador de centelleo líquido, con centellador en base tolueno-tritón.

(2) Previa precipitación con ácido tricloroacético (TCA) al 10% final y posterior filtrado con vacío sobre membrana filtrante de 0,45 μ de poro. Se leyó con centellador en base tolueno.

5.4 CONCENTRACION DE LA MUESTRA

Los valores de radioactividad anteriores se graficaron y se seleccionaron las fracciones de interés. Se concentró por ultracentrifugación a 150.000xg, 90 min a 4°C, previa dilución de la sacarosa presente con el mismo buffer a valores no mayores del 15 %. El concentrado se resuspendió en el buffer

adecuado. En algunos casos las proteínas se precipitaron con 3 volúmenes de etanol y acetato o cloruro de sodio 0,2M. Se dejaron a -20°C durante 1h o más y se centrifugaron a 10.000xg, 30min.

6 CARACTERIZACION DE PROTEINAS VIRALES

6.1 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Los concentrados de virus purificados, con o sin tratamiento, según se especifique en resultados se resuspendieron en la cantidad apropiada de "buffer de muestra" (0,1M Tris ClH pH 6,8, 2% SDS, 1% 2-mercaptoetanol, 0,002M de fenil metil sulfonilo fluoruro, 2% azul de bromofenol, 30% de sacarosa) y se calentaron durante 2 min a 100°C. Las proteínas fueron analizadas en un gel desnaturalizante de PAA-SDS al 10% según la metodología descrita por Laemmli (1970).

La electroforesis se llevó a cabo durante 18 hs. a 30 voltios.

6.2 REVELADO DE LAS PROTEINAS

Después de la corrida de los geles radioactivos se procesaron para fluorografía siguiendo el método de Bonner y Laskey (1974). Una vez procesados y secos los geles se usaron para

impresionar una placa radiográfica.durante el período necesario. La exposición se realizó a -70°C .

Para los geles no radioactivos se usó tinción con azul de Commassie. Los geles se fijaron durante 1h con ácido acético 7%, metanol 30% y luego se sumergieron en una solución de azul brillante de Coomassie al 0,025% en mezcla fijadora durante 1h. Se decoloraron con la misma mezcla fijadora.

Tinción Argéntica: Esta tinción se usó para geles conteniendo cantidad de proteínas menor a la detectable por la tinción con azul de Coomassie.

Los geles se fijaron en 10% etanol, 15% ácido acético, se tiñeron con solución de plata amoniacal y se revelaron con ácido cítrico 0,005% y formaldehído 0,019% según el método de Oakley et al. (1980)

6.3 TRANSFERENCIA

Las proteínas virales se separaron por electroforesis y la calle correspondiente a las proteínas virales se cortó y se estabilizó por 15 min en buffer de electrotransferencia (125mM Tris HCl pH 8,3; 96mM glicina; 10% metanol).

Para la transferencia se usó membrana PVDF, se hidrató sumergiéndola en metanol puro 2 ó 3 segundos y luego se enjuagó en agua destilada por igual tiempo. Se estabilizó en buffer de electrotransferencia por 15'.

Las esponjas y papeles de filtro Whatman N°3 se humedecieron en buffer de electrotransferencia hasta su utilización.

Se realizó electrotransferencia semiseca a 70V durante 2 horas. Una vez concluida se lavó la membrana en agua bidestilada varias veces a fin de eliminar la glicina. Se tiñeron las proteínas en 0,1% de azul de Commassie R-250, 50% metanol, 10% ácido acético hasta desaparición del fondo, luego se lavó varias veces en agua bidestilada para eliminar el ácido. La banda correspondiente a la glicoproteína Gp38 se cortó y se secó para realizar los estudios de microsecuenciación. El gel residual se tiñó como en 6.2, para evaluar la transferencia.

6.4 INMUNOTRANSFERENCIA

Luego de realizada la transferencia como en 6.3, pero en nitrocelulosa, el filtro se colocó en buffer de neutralización (buffer de transferencia más 3% de albúmina), durante 90 min a 37°C. Se lavó e incubó con el antisuero correspondiente 90 min a 37°C y luego 1 h a 37°C con anti-IgG de conejo unido a la peroxidasa. Se lavó y reveló con ortodianisidina hasta que las bandas fueron visibles.

6.5 DIGESTION ENZIMATICA

Los fluidos de las células BHK₂₁ infectadas con la cepa MC₂ del virus Junín se concentraron según 5.1 y purificaron por

ultracentrifugación en doble colchón de sacarosa, según 5.2. Se trabajó con virus marcado "in vivo" con aminoácidos [^{14}C] y con glucosamina [^{14}C]. La banda conteniendo el virus purificado, detectada por radioactividad se concentró por ultracentrifugación según 5.4. El pellet ultracentrifugado y resuspendido en buffer borato se incubó 1 h a 37°C en presencia de 1 mg/ml de quimiotripsina o con 0,1 mg/ml de pronasa, incubando una tercer muestra de virus como control.

7 OBTENCION DE INMUNOSUEROS

Los sueros se obtuvieron por inoculación de conejos con el marcado proteico en múltiples inyecciones subcutáneas cada 15 a 20 días y se sangraron por punción cardíaca.

8 SECUENCIACION DE AMINOACIDOS

La microsecuenciación de proteínas se realizó en LANAISS-PRO, UBA-CONICET (National facility for protein sequencing), en un secuenciador Applied Biosystem 477A, .que mediante la reacción de degradación de Edman, determina secuencialmente el aminoácido del extremo amino terminal de la proteína.

(Matsudaira, 1989).

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. CARACTERIZACION DE GLICOPROTEINAS

1.1 OPTIMIZACION DE LA PRODUCCION VIRAL

Un requisito importante para el estudio de las glicoproteínas, es poder disponer de una masa adecuada de virus altamente purificado. Debido al bajo rendimiento viral y a la falta de inhibición de la síntesis de proteínas en células infectadas con virus Junín, así como con otros arenavirus (Saleh et al., 1979; Buchmeier et al., 1978; Gimenez et al., 1983), en la mayor parte de los trabajos realizados, se recurrió a la inmunoprecipitación, a partir de células infectadas, de los péptidos virales con antisueros específicos, o, en otros casos, al uso de drogas para inhibir específicamente la síntesis de las proteínas celulares. Ambos recursos podrían introducir modificaciones en el sistema virus-célula, por lo tanto, previo al estudio de las glicoproteínas virales, decidimos encarar la optimización de las condiciones para obtener cantidades de virus adecuadas. Esta optimización, podría hacerse extensiva al estudio de glicoproteínas virales en células infectadas, de no obtenerse los resultados esperados a partir de virus purificados.

1.1.1 SUSTRATO CELULAR

Para la multiplicación del virus se emplearon las células BHK₂₁ que son las que producen mejor rendimiento viral extracelular. Alternativamente se utilizaron células Vero que, aunque con un rendimiento algo menor, ofrecían menores exigencias nutricionales. El rendimiento viral obtenido en cada sistema se muestra en la figura IV.1.

Con el fin de aumentar el rendimiento viral se trabajó en frascos roller y comparativamente con frascos planos. Se puede observar en la figura IV.2 que la curva de crecimiento del virus presenta en el primer caso un máximo al 3er. día de infección que se mantiene hasta el día 6to. En cambio en frascos planos el pico se logra entre los días 4^{to}, 5^{to} y 6^{to}.

Esta diferencia podría deberse a que en los frascos rollers el continuo lavado de la superficie eliminaría partículas defectivas facilitando así, la más rápida liberación del virus.

En todos los experimentos subsiguientes cuando no se especifica lo contrario se utilizó la línea celular BHK₂₁, y el virus radioactivo, se obtuvo en cultivos celulares planos.

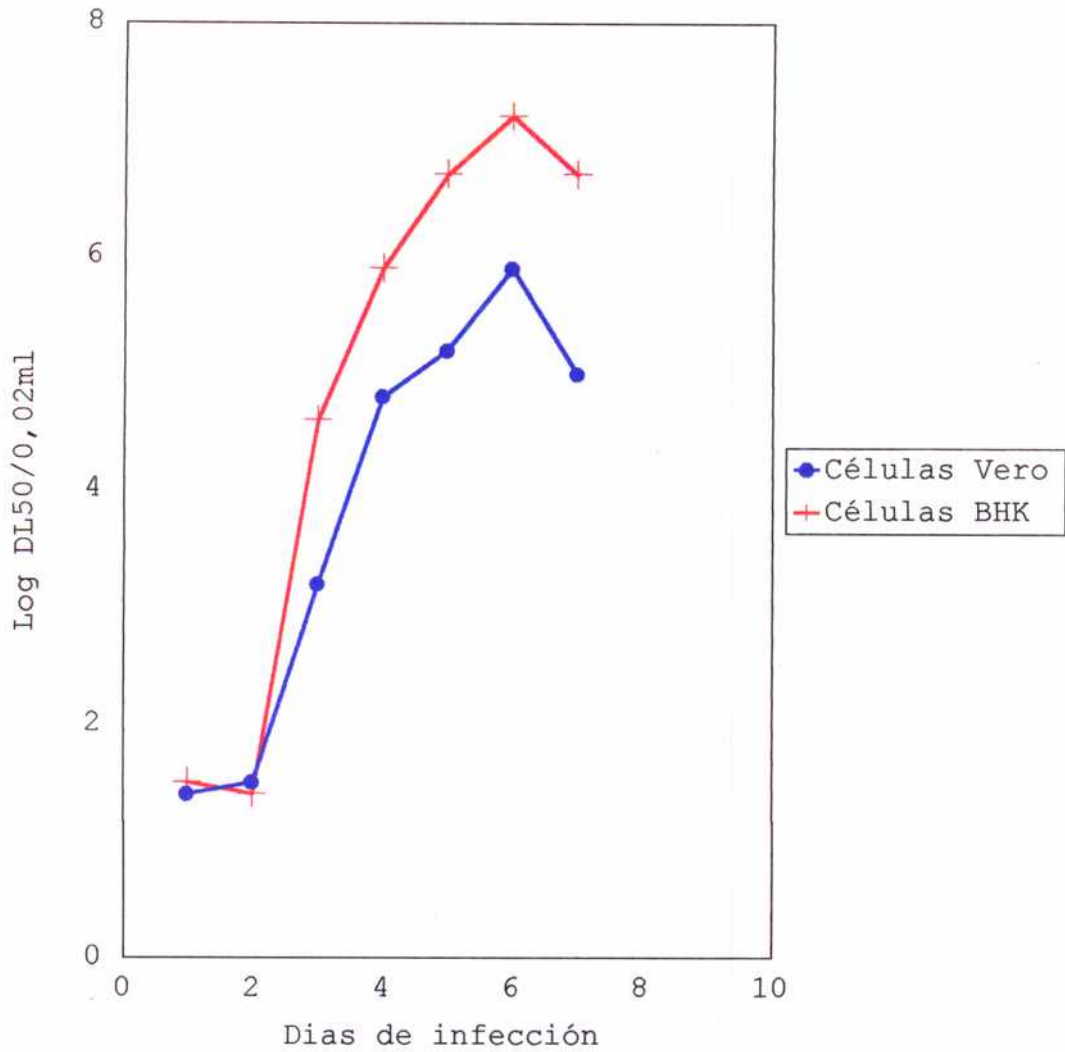


Figura IV.1: Producción de virus en células BHK₂₁ y Vero.

Células BHK₂₁ o Vero de 24 hs de crecimiento y 30 a 40% confluentes, se infectaron a una m.d.i. de 1 con la cepa MC₂ del VJ. A los tiempos indicados se tomaron muestras para dosar infectividad del fluido extracelular.

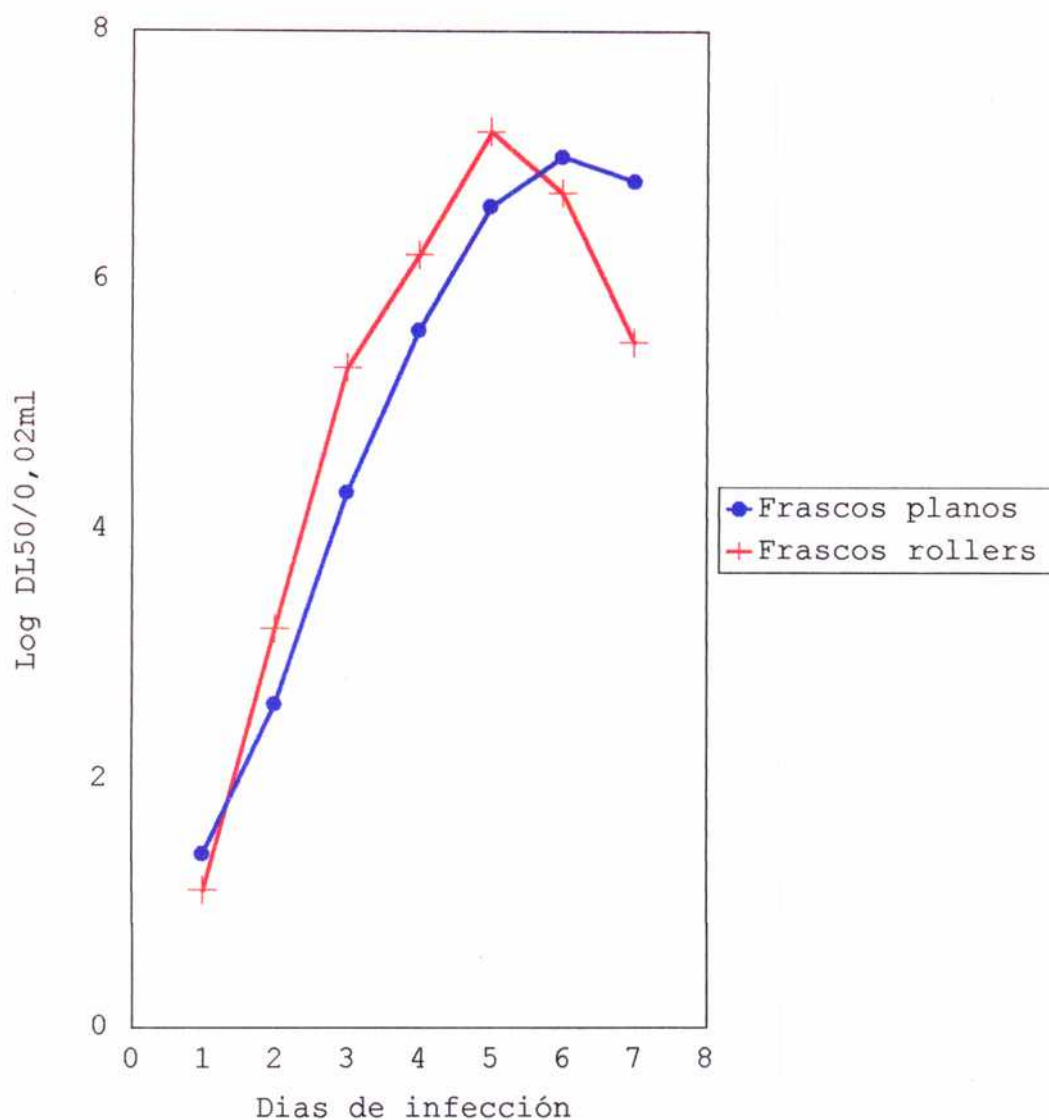


Figura IV.2: Producción de virus en células BHK₂₁ en frascos planos y rollers.

Células BHK₂₁ de 24 hs de crecimiento, 30 a 40% confluentes, en frascos planos o rollers se infectaron a una m.d.i. de 1 con la cepa MC₂ del VJ. A los tiempos indicados se tomaron muestras para dosar infectividad del fluido extracelular.

1.1.2 STOCKS VIRALES

En nuestro laboratorio la fuente de virus es el MC₂R₂, dos pasajes en ratón, y utilizarlo cada vez que se necesitaba fluido viral no era posible. Las posibilidades de mejorar el sistema virus-célula usando esta variable no permitió grandes variantes en cuanto al título viral. Ya vimos que trabajar con células BHK₂₁ en frascos rollers, era lo más ventajoso. Pero este sistema requería una cantidad de stocks virales importante, por lo tanto el stock MC₂R₃, es decir pasaje por tres cerebros de ratón con el que se realizó la infección de las curvas de crecimiento IV.1 y IV.2, no era el más adecuado. Se intentó a partir de MC₂R₃

a - Obtención de stock viral en células BHK₂₁

b - Obtención de stock viral MC₂R₄ en cerebros de ratón lactante.

La obtención en el sistema a no dio resultados, ya que, el fluido viral obtenido a una m.d.i. de 0.01, no sólo no mejoraba el rendimiento viral, sino que disminuía en aproximadamente 1 log el título del fluido viral cuando se utilizaba como stock para infectar células BHK₂₁ o Vero, comparativamente con el control infectado con el stock MC₂R₃, posiblemente de-

bido al enriquecimiento de partículas defectivas interferentes.

Un estudio detallado variando diversos parámetros tales como m.d.i., tiempos de cosecha, tipo de célula, etc, se hacía necesario en este punto del trabajo, pero dado que se requería una cantidad muy grande de animales para la titulación por DL_{50} , el único sistema disponible en ese momento, optamos por utilizar el método b que nos permitía alcanzar los objetivos más rápidamente con los mismos resultados finales que utilizando el MC_2R_3 y, hasta en algunos casos, levemente superior.

1.1.3 METODOS DE CONCENTRACION Y PURIFICACION

De acuerdo a los resultados de la curva de crecimiento viral (Fig.IV.2), se cosecharon para su concentración, los fluidos correspondientes a los días 3^{ro}, 4^{to}, 5^{to} y 6^{to} p.i. para los cultivos en frascos roller y 4^{to}, 5^{to} y 6^{to} p.i. para los cultivos en frascos planos.

Los fluidos se clarificaron para eliminar los restos celulares, y los sobrenadantes se guardaron a $-70^{\circ}C$, o se sometieron al procedimiento de concentración adecuado. En ningún caso los fluidos se congelaron sin ser clarificados.

Se probaron 3 técnicas de concentración:

a) Precipitación con polietilenglicol 6.000 al 7%, ClNa 2,3%.

Esta técnica fue utilizada cuando se requirieron grandes volúmenes de virus no radioactivo. La recuperación de virus infectivo resultó ser mejor que cuando se concentró por ultracentrifugación, más económica y menos laboriosa. Sin embargo, el fondo de impurezas de este concentrado, como base para el comienzo del proceso de purificación, fue el menos deseable; posiblemente debido a la precipitación conjunta de virus con proteínas celulares, particulados celulares menores y contaminantes proteicos diversos provenientes del suero utilizado durante la producción viral. Por eso en ningún caso se utilizó esta metodología para la preparación de inmunosueros; sí, para la obtención de grandes cantidades de glicoproteína sin marcar, pero realizando un paso adicional de purificación viral.

b) Ultracentrifugación.

El volumen reducido de los fluidos virales radioactivos es lo que nos permitió concentrarlos mediante esta técnica, con las condiciones detalladas en mat. y mét. Para todo el trabajo de esta tesis se utilizaron grandes cantidades de fluido viral, lo que nos hizo imposible emplear este método en todos los casos. Pero de haberse tratado de volúmenes más razonables, hubiera sido la técnica elegida, no tanto por su re-

cuperación sino por el grado de purificación alcanzable con menor número de pasos.

c) Filtración molecular

Utilizamos un equipo de filtración molecular de Millipore, conteniendo 5 membranas filtrantes Pellicon con una capacidad de retención de 10^6 . En la tabla IV.1, observamos el resultado de distintas pruebas, variando algunos parámetros, las que nos permitieron descartar el método no recirculante, que es el más rápido pero poco eficiente, con una recuperación del 27%, y adoptar la concentración recirculante para concentrar volúmenes de fluido viral no menor a 2 lts.

El virus concentrado por alguno de los métodos anteriores, se purificó mediante doble colchón de sacarosa 20-50%, y en los casos necesarios, se agregó un paso de purificación en gradiente continuo de sacarosa 20-60%.

virus Lote	Tiempo (hs) ^a	Proceso		Presión (lb/in ²) ^b	Volumen (ml)		Factor concen- tración	Infectividad DL 50/ml		Recuper ación ^c (%)
		Modo			Inicial	Final		Inicial	Final	
1	1,5	no recir- culante		35	2000	50	40	6,5x10 ⁷	7 x 10 ⁸	27
2	3,5	recir- culante		10	5000	50	100	2,5x10 ⁷	1,8x10 ⁹	72
3	4	recir- culante		25	8000	100	80	9x10 ⁷	6,0x10 ⁹	83

^a Tiempo total requerido para la concentración.

^b Presión promedio

Post-concentrado X 100
Pre-concentrado

TABLA IV.1: Concentración por filtración molecular.

El volumen de fluido viral clarificado indicado en cada prueba, se concentró por filtración molecular, utilizando 5 membranas filtrantes con una capacidad de retención de 10⁶.

1.2 ACTIVIDAD INMUNOGENICA DE LAS GLICOPROTEINAS

Una forma indirecta de conocer la actividad biológica de la o las glicoproteínas de envoltura del virus Junín, es inocular preparados virales que las contengan, y otros libres de ellas, en animales, con el fin de estudiar la respuesta inmunológica.

Para ello se solubilizaron las glicoproteínas por tratamiento del virus, parcialmente purificado y marcado con [³⁵S] metionina, con tritón X100 2%, durante 30 min. a temperatura ambiente. Así las partículas supuestamente libres de envoltura se separaron mediante ultracentrifugación a 100.000 xg durante una hora. El sobrenadante se concentró por precipitación con etanol-NaCl, y, tanto el pellet de ultracentrifugación, como el sobrenadante precipitado, se resuspendieron en buffer de muestra para análisis de proteínas en gel de PAA-SDS. Se puede observar en la figura IV.3 que la especie predominante en el sobrenadante es la banda de 38 kDa, y es la única proteína ausente de la fracción residual.

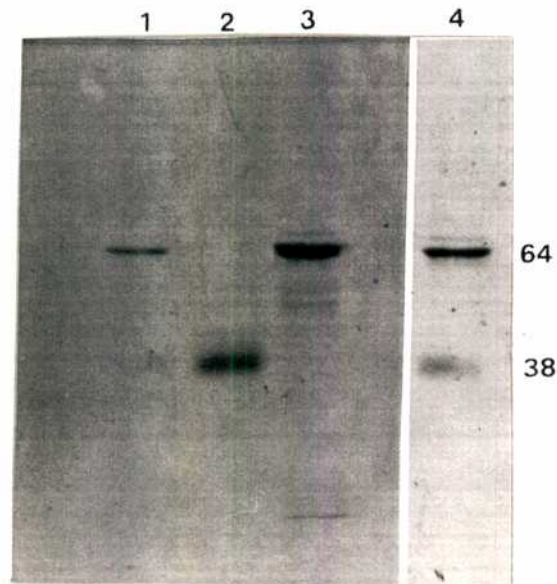


Figura IV.3: Análisis de las proteínas del virus Junín solubilizado con detergentes.

Células BHK₂₁ se infectaron con la cepa MC₂ y se marcaron con [³⁵S] metionina, a las 48 hs p.i. A los días 4, 5 y 6^{to} p.i., los fluidos extracelulares se cosecharon, clarificaron, concentraron y purificaron. El purificado viral se solubilizó, ultracentrifugó a 100.000xg, 2 hs y los polipéptidos se analizaron en un gel de PAA-SDS al 10%, previa precipitación del sobrenadante con 3 volúmenes de etanol y NaCl 0,2M.

Calle 1-Virus control sin tratar con detergentes.

Calle 2-Pellet de ultracentrifugación a 100.000xg.

Calle 3-Sobrenadante de ultracentrifugación precipitado.

Calle 4-Calle 1 con mayor tiempo de exposición

1.2.1 INDICE DE NEUTRALIZACION

Con el mismo tratamiento de solubilización se preparó virus, pero sin marcar, aumentando la cantidad de cultivos infectados y dosando proteínas según 5. Aproximadamente 30 µg de proteínas virales totales purificadas se solubilizaron con detergentes y sus fracciones se utilizaron en cada una de las descargas. Con estas preparaciones, es decir pellet y sobrenadante de ultracentrifugación, se inocularon conejos, con 2 inyecciones con un intervalo de 21 días, y se sangraron 21 días más tarde para dosar anticuerpos neutralizantes.

En la tabla IV.2 observamos los niveles de anticuerpos obtenidos con ambas preparaciones. Solamente los animales inoculados con el sobrenadante, es decir la fracción conteniendo la banda de 38kDa, supuestamente la glicoproteína Gp 38 desarrolló anticuerpos neutralizantes.

Tabla IV.2: Inmunización de conejos con fracciones virales.

Conejo Nro.	Inoculados con *	Log. DL ₅₀ de virus ⁺ frente a		IN [#]
		Suero Inicial	Suero inmune	
1	Sobrenadante	6,5	2,7	3,8
2	Sobrenadante	6,2	2,8	3,4
3	Sobrenadante	6,9	2,6	4,3
4	Sobrenadante	7,0	2,9	4,1
5	Pellet	6,2	6,0	0,2
6	Pellet	6,8	5,8	1,0
7	Pellet	7,1	6,2	0,9
8	Pellet	7,0	6,7	0,3
9	-----	6,9	5,4	1,5
10	-----	6,3	5,9	0,4
11	-----	7,2	6,3	0,9
12	-----	7,0	6,4	0,6

* Los conejos fueron inoculados vía subcutánea con adyuvante completo de Freund dos veces con intervalo de 21 días y sangrados 21 días más tarde.

Índice de neutralización

+ Suspensión de cerebros

1.2.2 EFECTO DE PROTECCION A LA DESCARGA CON VIRUS VIVO

Utilizamos cobayos para estudiar la protección conferida por estas dos preparaciones a la descarga con virus salvaje (cepa XJ), por ser ésta letal para los animales ensayados (Parodi et al, 1958), a diferencia de la cepa MC2, utilizada en el resto del trabajo de patogenicidad intermedia (Berría et al., 1967). Estos se inocularon según el esquema de la tabla IV.3, no observándose ninguna manifestación clínica en los animales inoculados con la fracción del sobrenadante, mientras que los inoculados tanto con la fracción del pellet como los controles sin inocular descargados con el virus letal, murieron aproximadamente a las tres semanas con sintomatología típica de Fiebre Hemorrágica Argentina.

En resumen el estudio inmunogénico de estas fracciones reveló que solamente la fracción soluble es capaz de producir anticuerpos neutralizantes en conejos y proteger a los cobayos contra el desafío con virus vivo.

Tabla IV.3: Protección conferida a los cobayos por fracciones virales frente a la descarga con virus letal.

Cobayo N°	Inmunizado con*	N° de dosis. Intervalo 21 días	Descarga [#] 10 DL ₅₀	Sobrevida
1	sobrenadante	2	si	vivo
2	sobrenadante	2	si	vivo
3	sobrenadante	2	si	vivo
4	sobrenadante	2	si	vivo
5	sobrenadante	2	si	vivo
6	sobrenadante	2	si	vivo
7	pellet	2	si	muerto
8	pellet	2	si	muerto
9	pellet	2	si	muerto
10	pellet	2	si	muerto
11	pellet	2	si	muerto
12	pellet	2	si	muerto
13	----	----	si	muerto
14	----	----	si	muerto
15	----	----	si	muerto
16	----	----	si	muerto
17	----	----	si	muerto
18	----	----	si	muerto

* Los animales se inocularon vía subcutánea con 5 ml de preparación con adyuvante completo de Freund.

Los animales se inocularon vía intramuscular con 0,3 ml de virus Junín cepa XJ, 21 días después de la última inoculación.

1.3 CONTENIDO DE AZUCARES. TIPO DE UNION

Tanto las proteínas como los hidratos de carbono fueron considerados, durante mucho tiempo, componentes con importancia biológica diferente, focalizando la atención en las proteínas y atribuyendo a los hidratos de carbono solamente funciones protectoras y energéticas. Sin embargo existen amplios indicios, de que el componente hidrato de carbono de las glicoproteínas, desempeña papeles biológicos importantes.

El antibiótico tunicamicina (TM) es un inhibidor específico de la formación del intermediario lipídico N-acetilglucosamina, por lo que su uso lleva a una inhibición total de la síntesis de la cadena de oligosacáridos unidos vía asparagina (Takatsuki et al, 1971, 1975; Tkatz & Lampen, 1975; Struck & Lennarz, 1977).

Esta droga resulta muy útil para investigar la contribución del componente carbohidrato a la maduración y a la actividad biológica de las glicoproteínas de los virus envueltos.

Nos interesó en el caso del virus Junín, asignar a las glicoproteínas algunas propiedades biológicas, como la que se estudió en el punto anterior y al mismo tiempo conocer que papel desempeña el hidrato de carbono en dichas actividades.

Examinaremos en esta parte, el efecto de TM en la síntesis

sis, glicosilación y maduración de las glicoproteínas del virus Junín.

1.3.1 EFECTO DE TM EN LA PRODUCCION DE LA PROGENIE VIRAL

Se estudió el efecto de diferentes concentraciones de TM en la producción de virus infeccioso en células BHK₂₁ a una m.d.i. de 1. La droga se agregó en diferentes concentraciones, 24 hs luego de la infección, y se mantuvo en el medio durante todo el experimento. A las 48 y 72 hs p.i., se tomaron muestras para dosar el título infectivo (Fig.IV.4). A una concentración de 0,5 µg /ml o mayor, la reducción de la infectividad es de 1 a 2 log a las 48 hs que a las 72 hs se puede observar una reducción de 4 logaritmos respecto del control. Las células tratadas con TM mostraron signos de toxicidad a tiempos mayores de 72 hs, efecto que habíamos comprobado en células control sin infectar, pero con TM, por lo que el experimento no se siguió más allá de las 72 hs.

1.3.2 EFECTO DE TM EN LA FORMACION DE PARTICULAS VIRALES

En el experimento anterior comprobamos que, aún con título reducido, se liberan partículas virales al medio celular en presencia de TM. Se analizaron las partículas virales mar-

cando las células al tiempo de agregado de TM, ya sea con [^{35}S] metionina o con [^{14}C] glucosamina, en presencia (15 μg /ml) y en ausencia de droga. A las 72 hs p.i. los fluidos celulares se cosecharon, clarificaron y el sobrenadante se concentró. El pellet viral tratado y sin tratar se purificó mediante gradiente de sacarosa (fig.IV.5 y IV.6). El material tratado con TM y marcado con [^{35}S] metionina bandea a una densidad levemente superior al control. Con respecto a la radioactividad incorporada vemos que en el pico de virus tratado, hay un 70% de radioactividad con respecto al sin tratar, a diferencia de lo que ocurre con la marca de [^{14}C] glucosamina donde, los valores del virus crecido con TM, están cerca del ruido de fondo, en el tubo correspondiente a la sedimentación del virus (Fig.IV.6 y tabla IV.4).

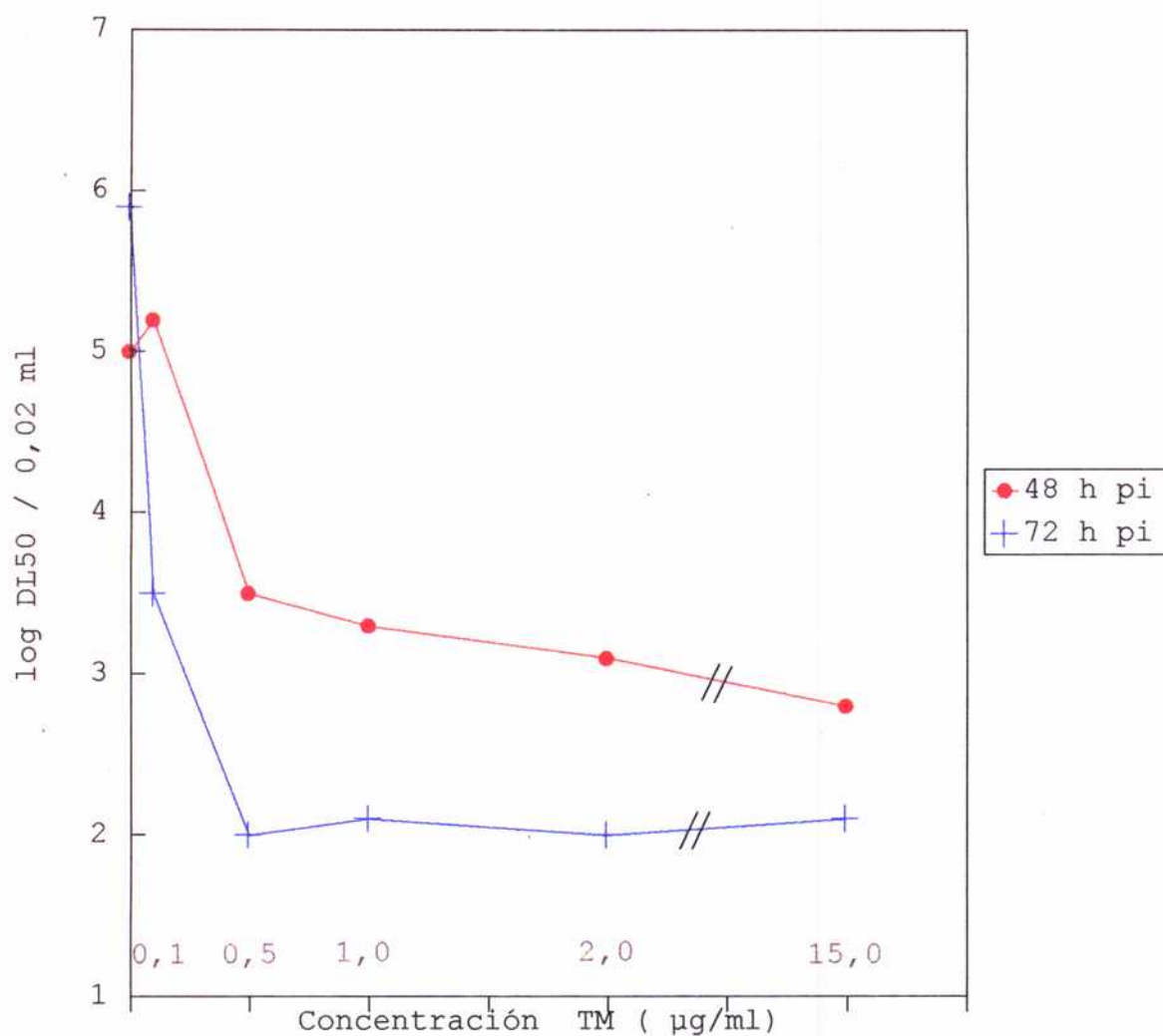


Figura IV.4: Efecto de TM en la producción de virus infeccioso
 Células BHK₂₁ se infectaron a una m.d.i. de 1 y a las 24 hs p.i. se agregó TM a las concentraciones indicadas. A las 48 y 72 hs se tomaron muestras de los cultivos tratados y control y se inocularon en ratones lactantes.

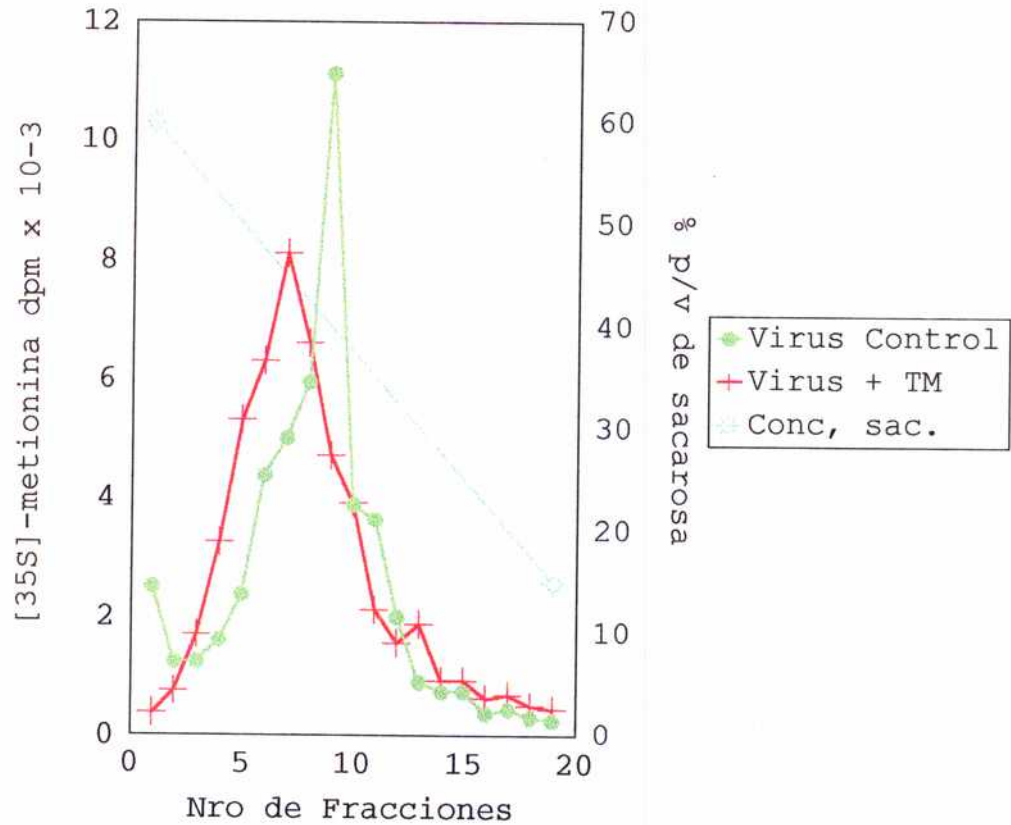


Figura IV.5: Purificación de viriones tratados con TM.

Proteínas virales marcadas.

El fluido viral tratado y sin tratar concentrado por ultracentrifugación se sembró en un gradiente continuo de sacarosa 15-60% y se centrifugó a 100.000xg durante 1h. Se midió radioactividad en cada una de las muestras obtenidas por punción del fondo del tubo.

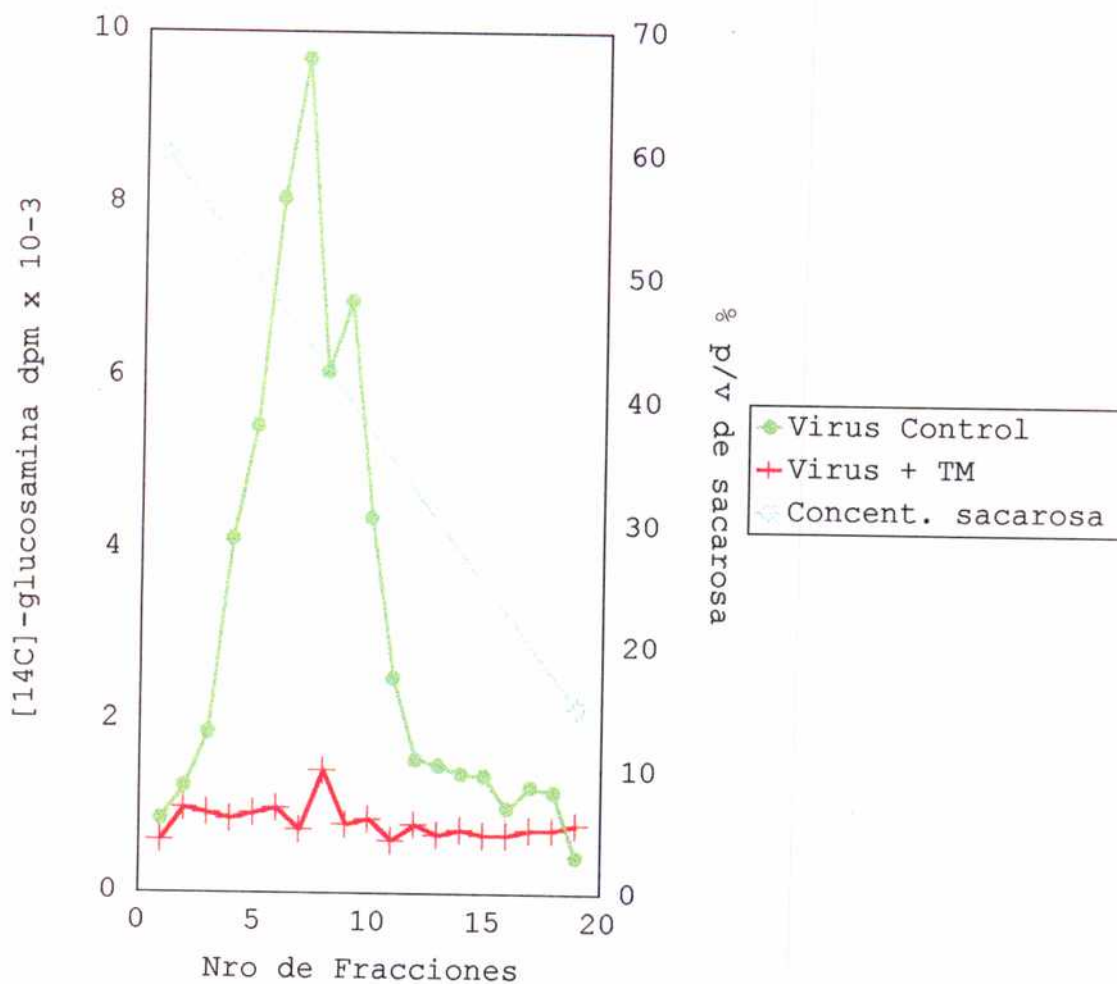


Figura IV.6: Purificación de viriones tratados con TM.

Glicoproteínas virales marcadas.

El fluido viral tratado y sin tratar concentrado por ultracentrifugación se sembró en un gradiente continuo de sacarosa 15-60% y se centrifugó a 100.000xg durante 1h. Se midió radioactividad en cada una de las muestras obtenidas por punción del fondo del tubo.

Tabla IV.4: Efecto de TM en el rendimiento del virus Junín.

TM dosis μg /ml ^a	Título DL ₅₀ 0,02ml ^b	Inhi- bición %	Metionina ³⁵ S		Glucosamina ¹⁴ C	
			Incorporac dpm X 10 ³ c	% Inhib	Incorporac dpm X 10 ³ c	% Inhib
0	10 ^{7,2}	0	118	0	31	0
15	10 ^{4,0}	99,9	81	31,4	4,7	85

^a La TM y el radioactivo se agregaron a las 24hs p.i. El fluido marcado y liberado de los cultivos tratados y sin tratar se cosechó a las 72hs p.i.

^b La titulación se realizó en cerebro de ratón lactante.

^c La incorporación de radioactividad se midió en el virus purificado.

1.3.3 SINTESIS DE POLIPEPTIDOS VIRALES EN PRESENCIA DE TM

Los picos de máxima radioactividad correspondientes al virus purificado y marcado con [^{35}S] metionina y con [^{14}C] glucosamina, del control y del cultivo tratado con 15 $\mu\text{g/ml}$ de TM, fueron concentrados por ultracentrifugación. El pellet proveniente de todo el material de cada pico, previa disociación se analizó en gel de PAA-SDS (Fig.IV.7A).

Como el tratamiento con TM resulta en una reducción de entre un 30 a 50%, consistente con una reducción general de la síntesis proteica observada en células tratadas con esta droga (tabla IV.5), en otro experimento similar se tomaron cantidades aproximadas, en valores de dpm, de los picos de las partículas virales marcadas en sus aa, para poder comparar cada polipéptido. En la figura IV.7B se observa el mismo perfil electroforético en ambas calles, con excepción de la Gp 38 que muestra una banda más definida, con movilidad electroforética aumentada, cuando es sintetizada en presencia de TM. Esta variación sería compatible con una disminución del contenido de azúcares.

Tabla IV.5: Efecto de TM en la síntesis de proteínas virales

Fracción	Tipo de célula	Total dpm X 10^{-2}	Porcentaje incorporado de [^{35}S]- metionina
Particulada	células no infectadas	5.992	100
	células no infectadas + TM	3.118	51
	células infectadas	4.646	100
	células infectadas + TM	2.607	56
Soluble	células no infectadas	4.872	100
	células no infectadas + TM	3.135	64
	células infectadas	4.771	100
	células infectadas + TM	27.41	57

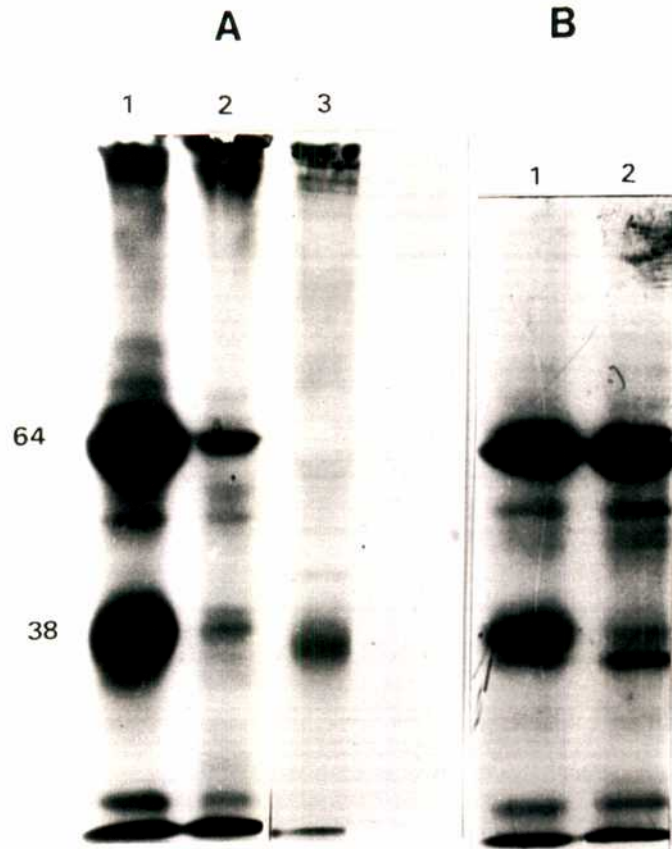


Figura IV.7: Perfil electroforético de los polipéptidos en presencia de TM.

Los picos de máxima radioactividad de los gradientes se concentraron por ultracentrifugación a 100.000xg durante 2hs y los pellets previa disociación se analizaron en un gel de PAA-SDS al 10 %.

A-Calle 1: Proteínas del virus control.

Calle 2: Proteínas del virus tratado con TM.

Calle 3: Glicoproteínas del virus control

B-Calle 1: Proteínas del virus control

Calle 2: Proteínas del virus tratado con TM.

2. AISLAMIENTO DE GLICOPROTEINAS

Para poder caracterizar los componentes de envoltura del virus Junín es esencial el desarrollo de un método preparativo simple de purificación de glicoproteínas y la preparación de un suero monoespecífico contra estas proteínas.

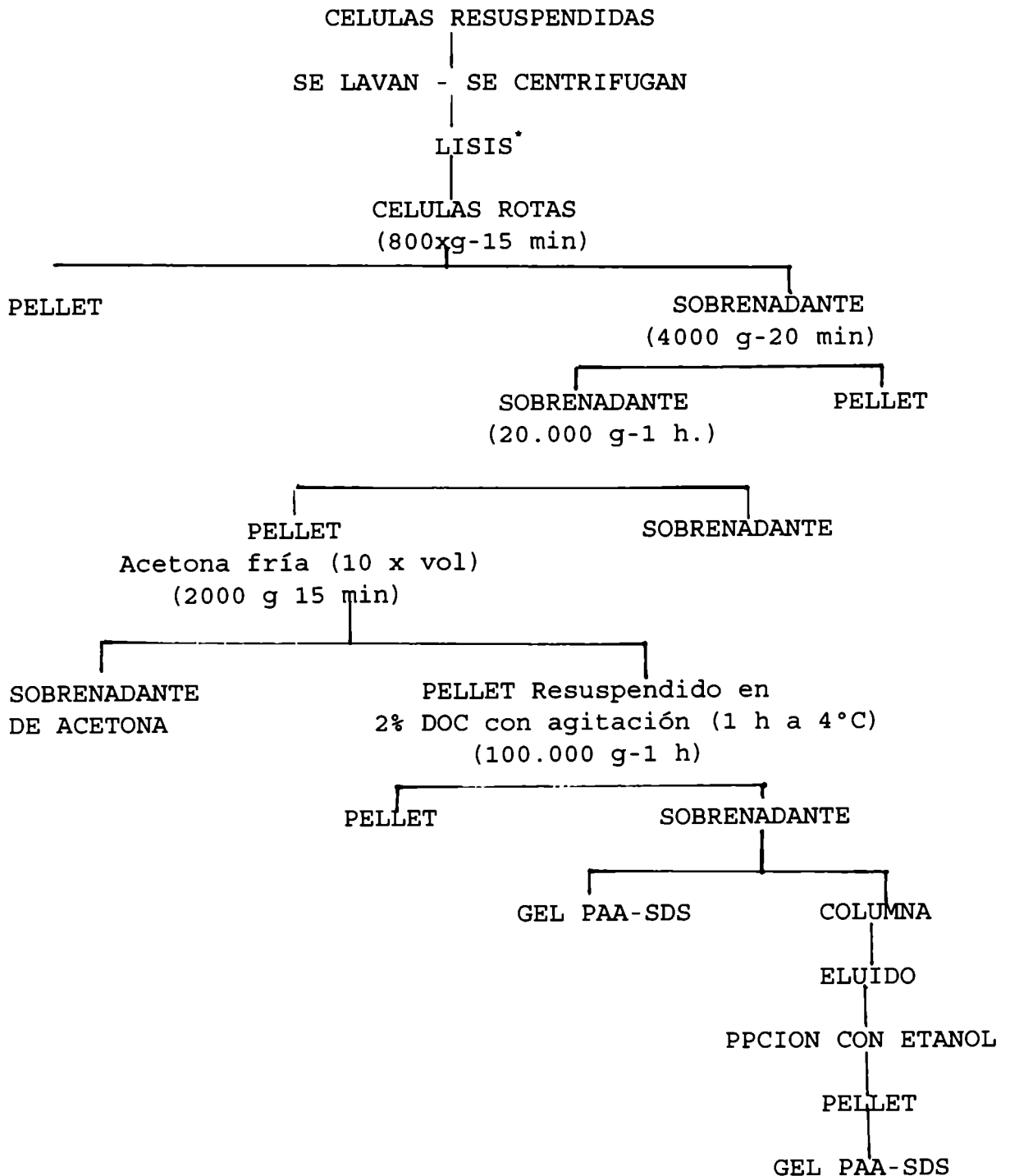
2.1 A PARTIR DE MEMBRANAS DE CELULAS INFECTADAS.

Como ya analizamos en el capítulo anterior, es difícil obtener grandes cantidades de virus Junín purificado, por lo que una buena fuente de glicoproteínas, podría encontrarse en las membranas de células infectadas. En base a trabajos realizados en nuestro laboratorio (De Mitri & Martinez Segovia, 1985), la obtención se realizó a partir de células de 72 hs de infección, momento en el cual el precursor Gp 72 se halla lo suficientemente procesado en sus glicoproteínas estructurales

El esquema de obtención y purificación se realizó como se resume en la figura IV.8.

El sobrenadante de centrifugación a 100.000 xg y precipitado con etanol, se sometió a purificación en columna de afinidad cromatográfica, empleando lectina-sefarosa 6MB de germen de trigo. Esta resina se une específicamente a los residuos N-acetilglucosamina y a sus derivados di y trisacáridos,

Figura IV.8: Esquema de purificación del extracto crudo de membranas por centrifugación diferencial



* Las células se lisaron con buffer Tris 100 mM, pH 7,2 conteniendo 0,5% de DOC.

mientras que a análogos tales como glucosamina y N-acetilgalactosamina no lo hace o se une muy débilmente (Nagata & Burger, 1974).

En la figura IV.9 observamos el perfil de elución y en la figura IV.10 el análisis en gel de PAA-SDS del pico resultante luego del arrastre de las glicoproteínas virales con el azúcar α -metilmanopiranosido

Podemos observar una banda más intensa a la altura de la glicoproteína de 38 kDa, pero otras proteínas parecen haberse coeluido. La misma purificación se realizó a distintos tiempos p.i., 48 y 96 hs, con idénticos resultados.

Por otra parte, si bien el método resultó efectivo, al menos para la Gp 38, su rendimiento no, posiblemente debido a la cantidad limitante de glicoproteínas virales en forma soluble disponibles en las células infectadas.

Este experimento llevaría a suponer que a medida que las glicoproteínas son sintetizadas y liberadas al medio extracelular, son empaquetadas por el virus, por lo que la obtención variando tiempos, tampoco mejoró el resultado.

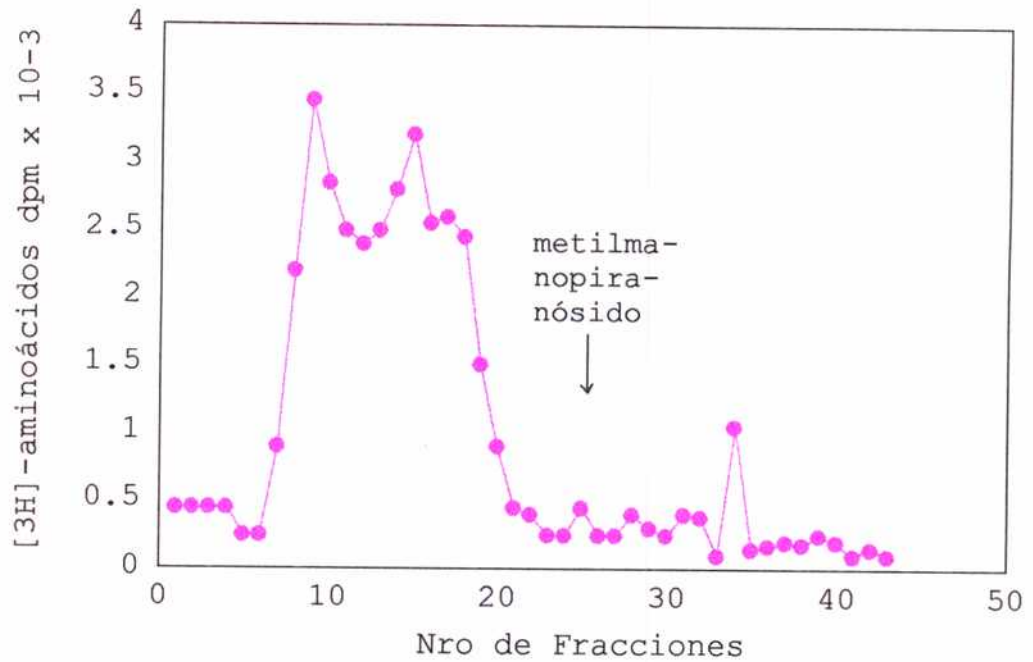


Figura IV.9: Purificación de proteínas por columna de afinidad cromatográfica.

Se utilizó una columna de Lectina sefarosa 6MB con germen de trigo. Se trabajó a un flujo de 2ml/h, tomando muestras de 0,5ml; en una alícuota de las cuales se leyó radioactividad simultáneamente. En el tubo 26 se agregó al buffer de elución (0,05M fosfato de sodio, pH 7; NaCl 0,2M) el azúcar α -metilmanopiranosido.

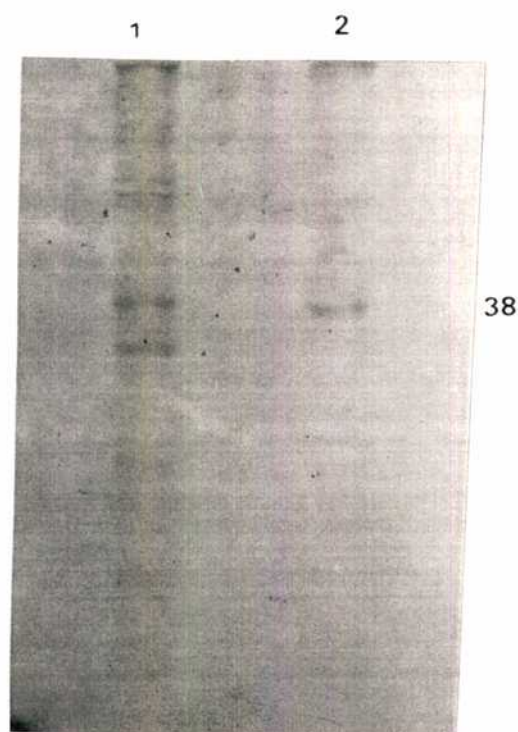


Figura IV.10: Análisis de proteínas purificadas por afinidad cromatográfica.

El pico de la purificación por columna se concentró por precipitación con etanol-NaCl y se sembró en un gel de PAA-SDS al 10%.

Calle 1-Pico purificado y precipitado.

Calle 2-Virus control purificado, marcado con [14 C]glucosamina.

2.2 A PARTIR DE CELULAS PERMANENTEMENTE INFECTADAS

Otra fuente posible de proteínas virales es purificar fluido de células permanentemente infectadas, analizando en primer lugar si las glicoproteínas se encuentran en este medio y en caso afirmativo si la cantidad presente justifica su preparación.

El primer experimento consistió en analizar día por día el fluido viral extracelular para evaluar, por un lado, la cantidad de glicoproteínas presentes en relación al conjunto de proteínas celulares, y por otro, decidir en qué momento repicar las células infectadas para obtener una línea permanentemente infectada como posible fuente de glicoproteínas virales.

En la figura IV.11 analizamos el perfil de proteínas del virus extracelular cosechado y purificado día por día en forma separada. Podemos observar que desde el día 4^{to} hasta el día 6^{to} p.i. justifica cosechar virus para aislar glicoproteínas, a diferencia de lo que ocurre con la nucleoproteína, que hasta el día 7^{to} p.i., se obtiene en cantidades significativas. (En la calle 6 por un problema técnico se perdió el 70% de la muestra, por lo cual la cantidad se estimó por ésta y otra corrida electroforética de un experimento similar).

Dada la posibilidad de obtener glicoproteínas a partir de

células permanentemente infectadas, el experimento se continuó cosechando virus hasta el día 18 inclusive, siendo nula la presencia de glicoproteínas a partir del día 10 y hasta el día 18, momento en el cual las células ya no se pudieron mantener.

De acuerdo a la figura IV.11, se estimó conveniente repicar las células BHK₂₁ infectadas 1 día antes del pico mayor de glicoproteínas, día 5^{to} p.i.; o sea al 4^{to} día se repicaron por primera vez y luego se mantuvieron duplicándolas cada 3 ó 4 días hasta llegar al pasaje 11 donde se amplificaron lo suficientemente como para obtener 4 frascos rollers en el pasaje 13. Cuando la monocapa estuvo 100% confluyente el fluido se cosechó durante 3 días, clarificó y purificó de la forma habitual. En la figura IV.12 vemos el perfil proteico de este fluido comparado con el fluido viral obtenido infectando 1 roller de células normales y cosechado también durante 3 días. No se observan diferencias significativas cualitativas, concluyéndose que este sistema podría constituir una fuente alternativa de glicoproteínas, pero si tenemos en cuenta que la relación de cultivos utilizada fue de 1 a 4, y que se genera un mayor riesgo al tener que repicarse células ya infectadas, optamos por trabajar con células recientemente infectadas.

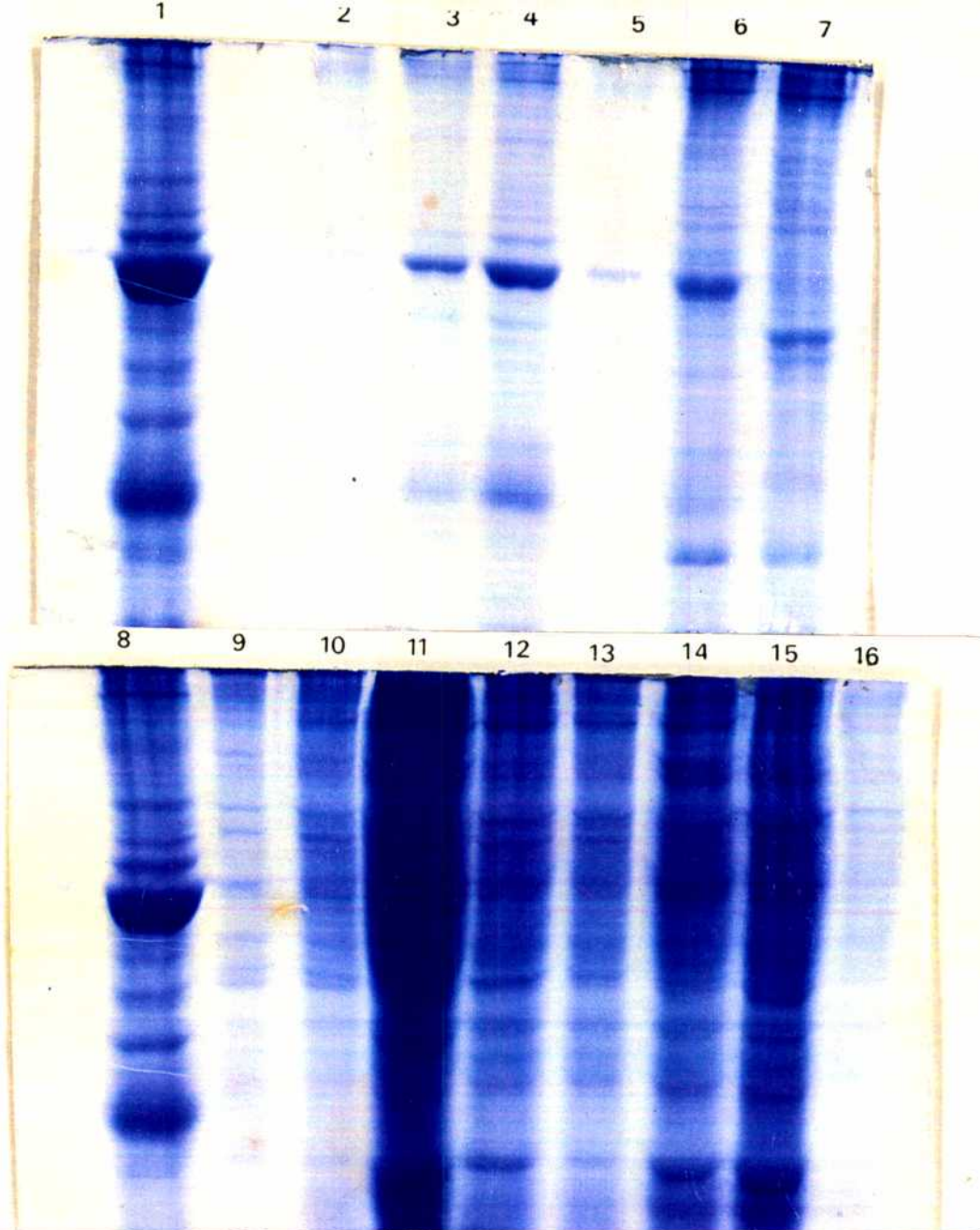


Figura IV.11: Análisis diario de proteínas de fluido extracelular.

El fluido extracelular se cosechó y purificó diariamente. El purificado se sembró en un gel de PAA-SDS al 10%.

Calle 1 y 8: Fluido viral cosechado 4^{to}, 5^{to} y 6^{to} día p.i., purificado de la forma habitual y sembrado como control.

Calle 2 a 6: Fluido de 3^{er} a 7^{to} día p.i. respectivamente.

Calle 7: Fluido de 10^{mo} día p.i.

Calle 9 a 16: Fluido de 11^{avo} a 18^{avo} día p.i. respectivamente.

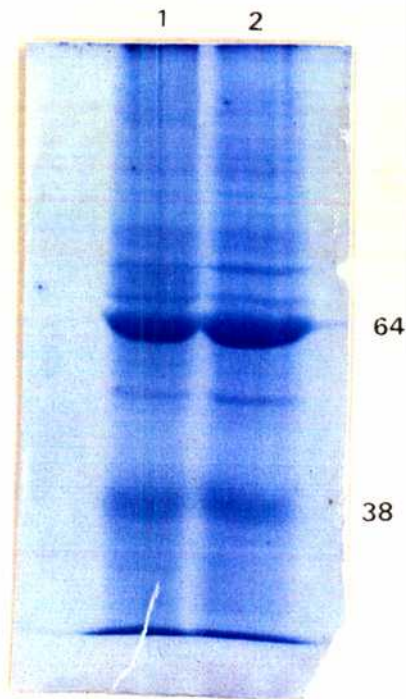


Figura IV.12: Análisis de proteínas aisladas a partir de células permanentemente infectadas.

Células BHK₂₁ infectadas se repicaron hasta el pasaje 13.

Fluido de 3 días de 4 frascos rollers, se purificó y analizó en un gel de PAA-SDS al 10%, comparado con fluido de 1 frasco roller de células normales cosechadas durante el mismo lapso.

Calle 1: Virus obtenido en células normales.

Calle 2: Virus obtenido en células permanentemente infectadas.

2.3 A PARTIR DE VIRIONES.

Una forma de obtener glicoproteínas en forma pura a partir de viriones, es su aislamiento luego de la separación de las proteínas virales en geles de poliacrilamida.

El siguiente experimento se realizó con el objetivo de aislar glicoproteína pura con actividad biológica, sin necesidad de equipamiento especialmente diseñado, ni diálisis o el uso de resinas que remuevan el SDS. El método que aquí describimos, se orientó a la visualización rápida, sin el empleo de colorantes, para lo cual la técnica se puso a punto con albúmina bovina pura.

La corrida electroforética se realizó con 0,1 % de SDS y se tiñó el gel con KCl en distintas concentraciones durante unos pocos minutos, hasta visualización de la banda; obteniéndose un límite de sensibilidad de 0,5 a 0,8 μ g. La mejor tinción se obtuvo con 1M de KCl y en el menor tiempo, 30 s. Sin embargo cuando estos parámetros se aplicaron a la tinción de la calle correspondiente a las proteínas del virus Junín, el fondo del gel hizo muy difícil la identificación de las proteínas, posiblemente debido a la formación de los complejos de dodecil sulfato de potasio-proteína, de difícil disolución.

Ya había sido comunicada la necesidad de disminuir la concentración de SDS desde 0,1% a 0,01-0,03% en el buffer de

corrida, con el objeto de minimizar el fondo de la tinción para la mejor visualización de las proteínas (Hager & Burgess, 1980). En nuestro caso esta disminución provocó menor eficiencia en la resolución de las bandas del gel. Según el protocolo de trabajo de los autores citados, resolvimos realizar una tinción muy breve de unos pocos segundos con 0,25 M de KCl permitiendo así mantener 0,1% de SDS en el buffer.

Esta técnica resultó ser muy útil dada su sencillez y rapidez. Sin embargo para el virus Junín, solamente fue posible su utilización en preparaciones doblemente purificadas, es decir por doble colchón de sacarosa y luego por gradiente continuo de sacarosa 20-60 %. Con un sólo paso de purificación resultó muy dudosa la identificación de cada una de las bandas.

2.3.1 RENATURALIZACION DE LOS COMPLEJOS PROTEINA DODECIL SULFATO DE SODIO.

El dodecil sulfato de sodio (SDS) ha demostrado ser un desnaturalizante proteico extremadamente efectivo, destruyendo generalmente toda la estructura terciaria y cuaternaria para formar un complejo proteína-SDS con forma de varilla. Las proteínas, desnaturalizadas de esta forma se han recuperado por distintos procedimientos, removiendo la proteína unida al SDS en condiciones tales que permite a la proteína replegarse y

recuperar así, posiblemente, su actividad y estructura tridimensional original. Estos métodos incluyen: diálisis, cromatografía de intercambio aniónica en urea, dilución en cloruro de guanidina, extracción del detergente en soluciones orgánicas, adición directa de un gran exceso molar del detergente no iónico Tritón X100 al complejo, etc.

Luego de un análisis bibliográfico detenido de todos estos métodos y de la baja recuperación de proteína obtenida por tinción con KCl, debido a la necesidad de una purificación exhaustiva, decidimos para nuestro caso intentar el aislamiento de la glicoproteína en geles, tiñendo una calle paralela con colorante y luego cortar y renaturalizar las restantes por el último de los métodos anteriormente mencionados.

El protocolo de trabajo se decidió en base a los resultados obtenidos de la renaturalización de dos enzimas citoplasmáticas, la lactato deshidrogenasa y la malato deshidrogenasa, las cuales permitieron al autor medir la actividad enzimática en función de la relación Tritón X-100/SDS y de la temperatura de incubación (Clarke, 1981).

Las rodajas de gel fueron incubadas toda la noche a 0°C en 1 ml de buffer Tris-HCl 0,01 M pH 7,8 conteniendo 30 mM de β -mercaptoetanol y 1% de Tritón X100, para su posterior utili-

zación como inmunógeno. Otra alternativa fue recuperar proteínas por electroelución y luego renaturalizarlas.

2.4 INMUNIZACION DE ANIMALES CON PROTEINAS PURIFICADAS

La recuperación de las proteínas renaturalizadas liberadas del gel, ya sea por macerado y agitación del gel o por electroelución fue de entre un 15 a un 30%. Ya que en este punto nos interesaba la recuperación de proteína biológicamente activa, pero obteniendo la mayor cantidad posible, optamos por inocular el macerado del gel, previa renaturalización, directamente en los conejos, vía intradérmica, sin utilizar coadyuvante. En la figura IV.13A, vemos la calle 1 que es la teñida paralela a la del gel preparativo, de donde se cortaron las bandas correspondientes a la Np 64 y a la Gp 38; y en las calles 2 y 3 de la figura IV.13B, se observa el control de pureza de cada banda. La inmunización se siguió con pruebas de ELISA. Se realizaron tres inoculaciones con aproximadamente 20 μg de proteínas puras, con intervalo de 15 días. Como control se utilizó la nucleoproteína viral Np 64. Los animales se sangraron 21 días luego de la última descarga, se separó el suero y se realizó una prueba de inmunotransferencia usando como soporte fijo una corrida en gel de PAA-SDS del virus total y como fase móvil los sueros obtenidos (Fig. IV.14).

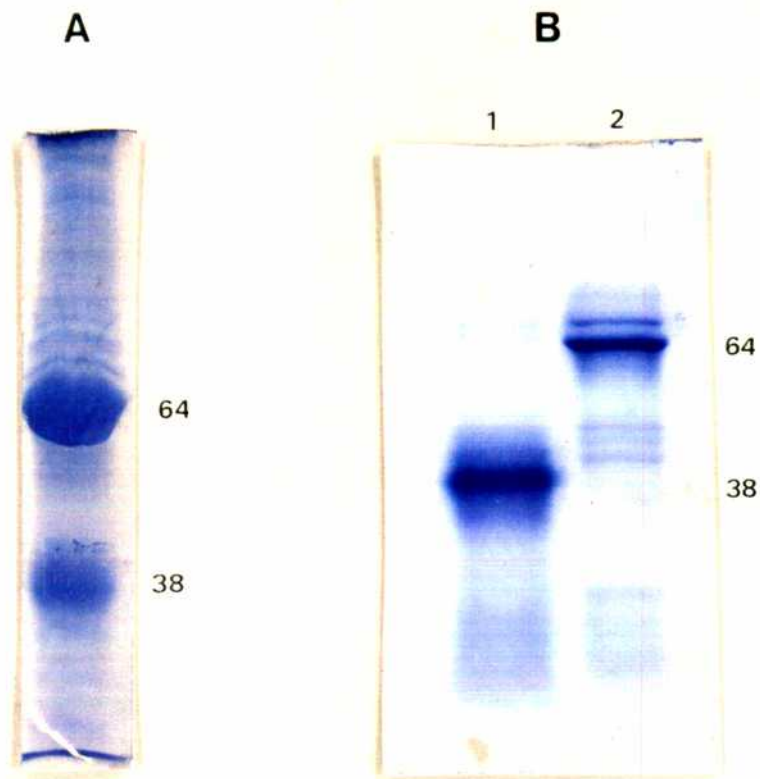


Figura IV.13: Análisis de proteínas aisladas a partir de viriones.

Se infectaron células BHK₂₁ con el VJ (m.d.i.= 1)

El fluido viral se cosechó al 3^{ro}, 4^{to}, 5^{to} y 6^{to} día p.i., se clarificó, concentró y purificó. Las proteínas se resolvieron en un gel de PAA-SDS al 10% y una sola calle se visualizó por tinción con azul de Commassie.

A- Proteínas antes de ser cortadas para inocular en conejos.

B- Una parte de las proteínas cortadas y eluidas del macerado de gel que se inculó a los animales.

1- GP38

2- Np64

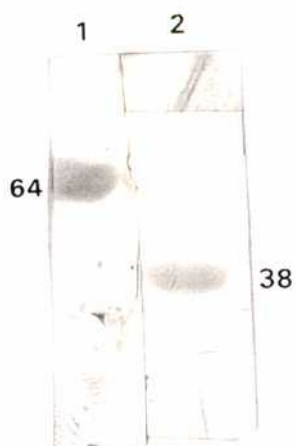


Figura IV.14: Inmunotransferencia de los sueros obtenidos de conejos por inmunización con proteínas puras.

El VJ purificado se corrió en un gel de PAA-SDS al 10%, se electrotransfirió a membrana de nitrocelulosa, se incubó con los antisueros preparados contra las proteínas purificadas y se reveló con antinmunoglobulinas de conejo unidas a la peroxidasa.

Calle 1: anti-Gp64.

Calle 2: anti-Gp38

3. LOCALIZACION GENOMICA DE GP 38.

En la mayoría de los arenavirus, existen en los viriones dos glicoproteínas llamadas Gp-1 y Gp-2 las que derivan del dominio N-terminal y C-terminal del precursor respectivamente (Buchmeier et al., 1987). Una excepción sería, la única glicoproteína externa G del virus Tacaribe la que deriva, aparentemente de la proteína GPC, aunque no se conoce su origen preciso dentro de su precursor (Gard et al., 1977). En los puntos precedentes estudiamos y caracterizamos parcialmente un componente de envoltura, identificada como una única banda en geles de PAA-SDS, con actividad inmunogénica importante. La metodología anteriormente utilizada no nos permitía definir si se trataba de una sola glicoproteína o más.

Por eso, consideramos que, para el VJ, una vez obtenida Gp38 suficientemente purificada, determinar la secuencia de sus aminoácidos nos respondería a la duda anteriormente mencionada y sería una forma directa de conocer la localización genómica de GP38 en el gen GPC.

Además un aporte interesante a este trabajo de caracterización, sería conocer el sitio de clivaje proteolítico del precursor GPC que dá origen a las dos posibles glicoproteínas GP-1 y GP-2 por similitud a los otros virus del grupo.

3.1 ESTRATEGIA PARA LA OBTENCION DE SECUENCIA AMINOACIDICA PARCIAL DE GP38.

La obtención de la secuencia aminoacídica de la proteína, se decidió en base a los resultados del capítulo correspondiente a aislamiento, donde discutimos los problemas para obtener cantidades apreciables de la glicoproteína Gp38 en forma pura.

Al decidir la estrategia de purificación y obtención de Gp 38 para su secuenciación, debíamos tener en cuenta que, el principal factor por el cual la mayoría de las proteínas no son susceptibles a la degradación de Edman, es el bloqueo químico del grupo amino terminal. Si bien existen reacciones de desbloqueo, no son aconsejables sobre todo trabajando con escaso material, ya que lo normal es no conocer el agente químico bloqueante y por lo tanto se hace necesario realizar muchos ensayos hasta su reconocimiento. Si el bloqueo existe, en general se puede proceder al clivaje interno de la proteína para obtener distintos péptidos, los que, separados por cromatografía de alta performance (HPLC), nos permiten secuenciar a la proteína en forma parcial o total si está desbloqueada.

El método de trabajo que garantizó la no contaminación de Gp38 con otras proteínas celulares y, que evita bloqueos en la región N-Terminal, que es la que nos interesa para permitir su

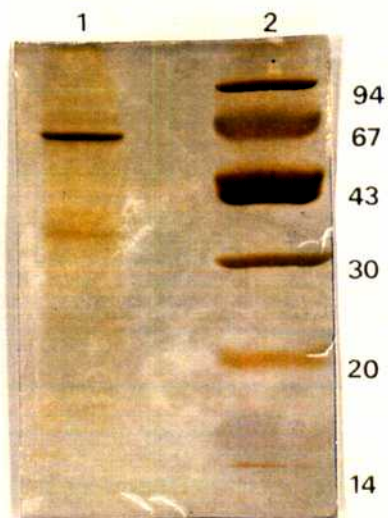
ubicación dentro del genoma de GPC, fue la microsecuenciación a partir de virus purificado, separadas sus proteínas en gel de PAA-SDS y electrotransferidas a membranas de PVDF.

3.2 PURIFICACION DE GP38 POR GEL DE PAA-SDS.

En la figura IV.15 observamos el perfil electroforético de las proteínas del virus Junín purificadas por gradiente discontinuo y continuo de sacarosa. Mediante esta electroforesis, previa a la preparativa, dosamos la cantidad de material a sembrar en el gel, de forma tal de no sobrecargar la calle, pero sí de obtener la máxima cantidad posible de proteína.

De acuerdo a los niveles de sensibilidad de detección proteica en nuestro laboratorio, la relación colorimétrica visual entre tinción de plata a tinción con azul de Commassie es de 1/50 aproximadamente. Realizamos entonces, un gel preparativo con 50 veces más de material que el utilizado en la calle 3 del gel de la figura IV.15.

Se optimizaron todas las condiciones de trabajo para evitar bloqueos químicos del residuo amino terminal, utilizando



**Figura IV.15: Dosaje del material necesario para la microse
cuenciación.**

Se infectaron células BHK21 con el VJ (m.d.i.= 1). El fluido viral se cosechó al 4^{to}, 5^{to} y 6^{to} día p.i., se clarificó, concentró y purificó. Las proteínas se resolvieron en un gel de PAA-SDS al 10% y se revelaron por tinción argéntica.

Calle 1-Control de peso molecular.

Calle 2-Virus purificado.

Calle 3-Virus purificado.

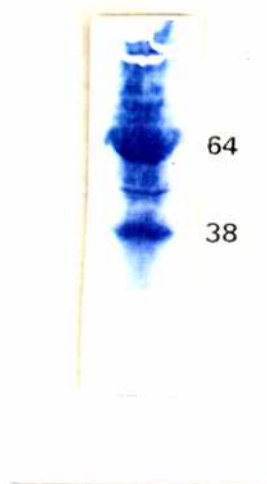


Figura IV.16: Purificación de GP 38 mediante gel de PAA-SDS y electrotransferencia a membrana de PVDF.

Se infectaron células BHK21 con el VJ (m.d.i.= 1). El fluido viral se cosechó al 4^{to}, 5^{to} y 6^{to} día p.i., se clarificó, concentró y purificó. Las proteínas se resolvieron en un gel de PAA-SDS al 10%, se electrotransfirieron y la membrana se tiñó durante 5 min con 0,1% de azul de Commassie en metanol 50%. Se destiñó con-50% de metanol y 10% de ácido acético. A- Gel resultante luego de la transferencia a membrana de PVDF.

reactivos de la más alta pureza disponible; se minimizaron los tiempos y se manipuló la membrana de PVDF bajo campana de área estéril, para evitar todo tipo de contaminación proteica.

En la figura IV.16 vemos el resultado de la corrida electroforética luego de transferidas las proteínas a membrana de PVDF y teñido el gel resultante con azul de Coomassie. Una cantidad aproximadamente igual fue la que se observó en la membrana de la cual se cortó la banda indicada como Gp38. Suponemos que las proteínas remanentes en el gel de la figura IV.16, no fueron retenidas en la membrana por capacidad limitante.

3.3 DETERMINACION DE LA SECUENCIA N-TERMINAL.

Debido a la escasa cantidad de material viral purificado no nos fue posible la valoración de proteínas, por lo tanto estimamos este valor por comparación con cantidades conocidas de preparaciones puras, como albúmina bovina corridas en otras calles del mismo gel y reveladas con la misma tinción (Fig IV.17).

Estimativamente, ya que la intensidad del color depende de la estructura primaria de la proteína, aislamos un total de 1,5 μg de Gp 38 por lo que, tomando como valor aproximado de

peso molecular 38kDa tendríamos de 40 pm totales de proteína para su análisis.

Se secuenció la mitad transversal de la banda de la figura IV.16 transferida a membrana de PVDF, alrededor de unos 20 pm, debido a que superaba las dimensiones de la cámara de reacción del secuenciador automático donde se realizó el análisis (ver Mat. y Mét.).

Teóricamente, la cantidad suficiente para secuenciar, es de unos 10 pm de proteína o péptido y hasta a veces menos. De esa manera el material obtenido se encontraría dentro del límite, calculando que normalmente entre 50-80% del material proteico es secuenciable, siempre y cuando esté libre de sales como Tris, aminos o excesivo SDS (máximo 1mg).

El resultado de este primer intento de secuenciación por el método de degradación de Edman no fue muy aliciente. El informe de microsecuenciación del Lanais-Pro indica que no se pudo determinar la secuencia ya que, en los primeros ciclos aparecen algunas señales, que, por coincidir con contaminantes habituales, como glicina o alanina, hacen muy dudosa su asignación. A partir del tercer ciclo aparecen varias señales que no decaen y que podrían deberse a rupturas inespecíficas de la proteína. Por otra parte la imposibilidad de realizar la determinación estaría indicando un caso de bloqueo N-Terminal.

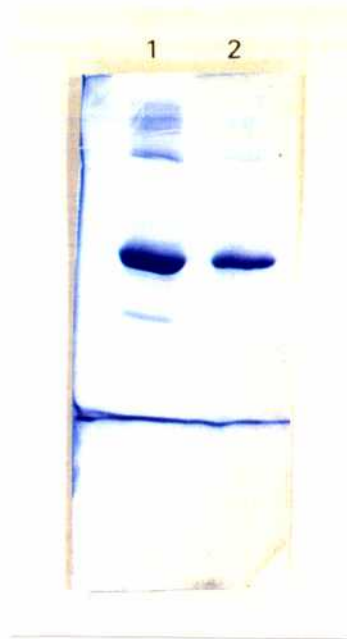


Figura IV.17: Estimación de la cantidad de Gp38 por comparación con albúmina bovina.

Cantidades conocidas de albúmina bovina purificada se corrieron en un gel de PAA-SDS al 10% y se tiñeron con azul de Commassie.

Calle 1: 5 μg de albúmina bovina

Calle 2: 2,5 μg de albúmina bovina

3.3.1 RECUPERACION DE PROTEINA SECUENCIABLE.

Luego del infructuoso intento de secuenciación, y antes de volver a realizar otro, quisimos conocer el motivo de este resultado negativo, para lo cual empleamos dos procedimientos. Sobre la misma mitad de la banda ya utilizada y recuperada del secuenciador realizamos digestión química de la proteína con BrCN, con el sólo fin de estimar masa proteica. Los péptidos resultantes no se separaron y se sometió la banda nuevamente a degradación de Edman. Los primeros tres ciclos mostraron asignación de picos, pero no únicos, lo cual era de esperar al estar analizándose varios residuos amino terminales a la vez. La masa estimada en este caso fue de 20 pmoles de material (Fig. IV.18).

Por otro lado utilizamos la otra mitad de la banda ya transferida, idéntica a la anterior para estudiar composición de aminoácidos.

El informe (Fig. IV.19) da cuenta de un total aproximado 5.000 pmoles (columna PM by height) que corresponden a unos 14 pmoles de proteína de PM 38kDa, cantidad suficiente para obtener señales al menos en los primeros ciclos.

Este resultado confirmaría lo ya estimado por digestión

química con BrCN de la banda ya procesada, descartando así la atribución del resultado negativo a la escasa cantidad de muestra.

3.3.2 ANALISIS DE LA SECUENCIA INTERNA DE AMINOACIDOS.

Cuando no es posible secuenciar una proteína por el método del aa aminoterminal, existe la alternativa de clivar la proteína con CNBr en 70% de ácido fórmico, que corta específicamente en metionina, dejando generalmente un número pequeño de péptidos por ser éste un aa poco frecuente (Williams 1989). Sin embargo, al estudiar la secuencia publicada de GPC, (Ghiringhelli et al., 1991), mediante el programa "Análisis de clivaje proteico" de PC/Gene, observamos en la figura IV.20 un total de 13 fragmentos, correspondiendo 6 a GP-1, y 7 a GP-2 de acuerdo a los sitios de corte predichos. De su análisis surge la baja probabilidad de obtener en forma pura cada uno de estos péptidos, para determinar su secuencia amino terminal e intentar reconstruir el mapa de la proteína.

Pmol By Height Report

Sample ID: 28101010 (initiated 10/08/93 8:45pm) BASELINE CORRECTED

Turntable Position: 9	Sampling Interval: 1.0 sec
Date Start : 0.00 min	Samples In Run : 35
Data Duration : 19.00 min	Operator ID : SUSANA
Peak Ht Threshold : 1000 uAU	Int. Std. Amt : 250 pmol

Calibration File : 281-RA7A	(initiated 10/12/93 1:56pm)
Reference Time : 0.00 min	(No ISID Peak Specified)
Reference Offset 1: 0.00 min	
Reference Offset 2: 0.00 min	

Integration Interval: 5.0 to 19.0 min

PEAK ID	RET. TIME min	CAL. TIME min	PEAK HEIGHT uAU	PMOL BY HEIGHT	PMOL CORRECTED INT STD
	5.05	-----	2587	-----	-----
Aspartic Acid	6.43	6.35	86707	664.28	0.00
Glutamic Acid	6.72	6.65	81600	553.93	0.00
Serine	7.45	7.38	47957	476.78	0.00
Glycine	7.80	7.75	79125	751.85	0.00
Histidine	8.05	8.00	14522	113.32	0.00
Arginine	8.58	8.53	34194	228.10	0.00
Threonine	8.92	8.88	26476	199.61	0.00
Alanine	9.27	9.23	38209	285.74	0.00
Proline	9.55	9.55	28177	191.26	0.00
	9.88	-----	10884	-----	-----
	11.17	-----	2294	-----	-----
Tyrosine	12.02	12.02	24354	146.38	0.00
	12.30	-----	1620	-----	-----
	12.50	-----	3394	-----	-----
Valine	13.02	13.03	27942	179.13	0.00
Methionine	13.35	13.35	13963	90.78	0.00
	13.82	-----	1314	-----	-----
	14.20	-----	4486	-----	-----
Cysteine	14.55	14.45	1075	5.66	0.00
	15.05	-----	1631	-----	-----
Isoleucine	15.27	15.28	29161	175.57	0.00
Leucine	15.47	15.50	71455	454.87	0.00
NOR-LEU	16.17	16.17	28038	263.64	0.00
	16.37	-----	2377	-----	-----
Phenylalanine	16.60	16.60	12727	92.64	0.00
Lysine	17.20	17.20	35874	131.04	0.00
	17.58	-----	13383	-----	-----
	17.97	-----	1517	-----	-----
	18.65	-----	1139	-----	-----

Minimum Peak Threshold: 1000 uAU (22 peaks below threshold)
 (30 peaks found)
 (18 peaks matched)

Figura IV.19: Informe de composición de aminoácidos

Figura IV.20: Análisis de clivaje de GPC con CNBr

1) Gly-	2 to Met-	8	7aa	829	6.1	30 h	QGFISFM
2) Gln-	9 to Met-	128	120aa	13231	5.6	0.8 h	QEIPTFLOEAL/.../YDVIIQHPADM
3) Ser-	129 to Met-	145	17aa	2117	6.1	1.9 h	SWCSKSDDDQIRLSQWFM
4) Asn-	146 to Met-	192	47aa	5439	9.8	1.4 h	NAVGHWDYLDP/.../ENYAKKFKTGM
5) His-	193 to Met-	211	19aa	2294	6	3.5 h	HHLYREYPDSCLDGKLCML
6) Lys-	212 to Met-	272	61aa	6992	8.8	1.3 h	KAQPTSWPLQC/.../TPGGYCLEEWM
7) Leu-	273 to Met-	278	6aa	632	10.1	5.5 h	LVAAKM
8) Lys-	279 to Met-	300	22aa	2448	5.2	1.3 h	KCFGNTAVAKCNLNHDSEFCDM
9) Leu-	301 to Met-	325	25aa	3010	10.1	5.5 h	LRLFDYNKNAIKTLNDETKKQVNL
10) Gly-	326 to Met-	339	14aa	1503	2.9	30 h	GQTINALISDNLLM
11) Lys-	340 to Met-	347	8aa	1031	10.7	1.3 h	KNKIRELM
12) Ser-	348 to Met-	402	55aa	6660	6	1.9 h	SVPYCNYTKFW/.../ILESDFLISEM
13) Leu-	403 to His-	481	79aa	9016	10.4	5.5 h	LSKEYSDRQK/.../LKKPTVWRRGH

La predicción de los sitios de corte del CNBr en el aa metionina se realizó sobre la secuencia de GPC publicada de JUNINMC2 usando el programa PC-Gene)

3.4 DETERMINACION DE LA SECUENCIA N-TERMINAL EN PRESENCIA DE INHIBIDOR DE GLICOSILACION

Es sabido que el componente hidrato de carbono de las glicoproteínas, interfiere en el análisis de la secuencia de aminoácidos. El hecho de realizar este intento aún conociendo esta limitación, se fundó en la esperanza de obtener al menos 10 a 20 residuos de aa amino terminales que no necesariamente estuvieran unidos a azúcares y que de lograrlo nos permitiría una primera ubicación de Gp38 en el gen de GPC.

Conociendo que la cantidad de proteína era suficiente para la reacción, decidimos eliminar la posible dificultad de secuenciar debido a los hidratos de carbono. Preparamos aproximadamente el mismo material viral, pero crecido en presencia de 15 $\mu\text{g/ml}$ de tunicamicina, agregado a las 24hs p.i. Nuevamente se tomaron todas las precauciones posibles para evitar el bloqueo del grupo N-terminal y para aumentar la cantidad de material secuenciable, se colocaron las dos mitades de banda en la cámara de reacción. La figura IV.21 muestra el perfil electroforético en presencia del inhibidor de glicosilación, teñido con tinción argéntica, para estimar la cantidad de proteína.

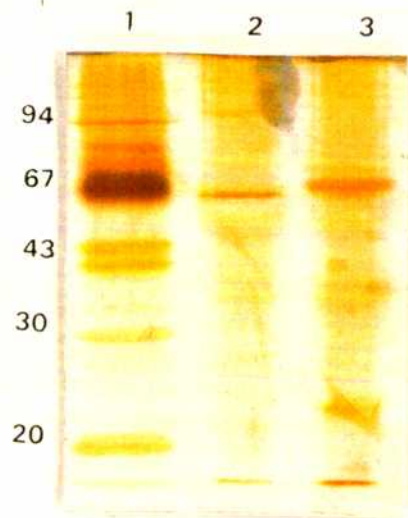


Figura IV.21: Perfil electofóretico de las proteínas virales obtenidas con inhibidor de la glicosilación.

Células BHK₂₁ se infectaron a una m.d.i de 1 y a las 24 hs p.i. se agregó 15µg de TM. A las 72 hs p.i. se cosecharon los fluidos, se concentraron y purificaron, y las proteínas se resolvieron en un gel de PAA-SDS al 10% teñidas mediante coloración argéntica.

Calle 1-Virus sin glicosilar.

Calle 2-Control de peso molecular.

A pesar de estar en presencia de una banda de Gp38 más fina, debida posiblemente a la falta de azúcares, por comparación con la nucleoproteína supusimos que usando 50 veces más material que el observado en el gel de la figura IV.21, sería suficiente para la degradación de Edman.

En este nuevo intento se trabajó con aproximadamente 10 pmoles, obteniéndose dos lecturas por cada ciclo de degradación de Edman, con una intensidad similar para cada una.

Con el objeto de no distribuir los aa en dos secuencias arbitrarias, ordenamos los 8 primeros en todas las combinaciones posibles y sometimos las 254 secuencias obtenidas a una comparación, mediante el programa Fastscan, con la secuencia publicada de GPC de VJ. Como se observa en la tabla IV.6 de puntaje de similitud, de las 20 secuencias con mejor puntaje, sólo fueron significativos dos de los ordenamientos posibles y éstos presentaban homología en dos zonas definidas de la secuencia de GPC, correspondiendo a las zonas putativas de GP-1 y GP-2. Ordenamos de la forma más lógica llamando a cada una de las dos secuencias obtenidas GP 38-1 y GP 38-2 respectivamente (tabla IV.7).

Tabla IV.6: Análisis de los ordenamientos posibles de los resultados de microsecuenciación. (Fastscan).

Se realizó el análisis de las 254 secuencias posibles tomando los primeros 8aa.

Nb	Absolute score	Relative score (%)	Sequence name	Position	Position in JUNINMC2
1	308	1.2	PAU11	3 - 8	56 - 61
2	308	1.2	PAU521	3 - 8	56 - 61
3	308	1.2	PAU1011	3 - 8	56 - 61
4	308	1.2	PAU1331	3 - 8	56 - 61
5	299	1.16	PAU832	2 - 8	249 - 255
6	290	1.13	PAU361	4 - 8	57 - 61
7	290	1.13	PAU681	4 - 8	57 - 61
8	290	1.13	PAU1171	4 - 8	57 - 61
9	290	1.13	PAU1491	4 - 8	57 - 61
10	282	1.09	PAU1602	1 - 8	248 - 255
11	273	1.06	PAU831	2 - 7	249 - 254
12	264	1.02	PAU791	2 - 8	249 - 255
13	261	1.01	PAU241	3 - 8	56 - 61
14	261	1.01	PAU561	3 - 8	56 - 61
15	261	1.01	PAU1051	3 - 8	56 - 61
16	261	1.01	PAU1371	3 - 8	56 - 61
17	256	.99	PAU1601	1 - 7	248 - 254
18	249	.97	PAU12	3 - 7	56 - 60
19	249	.97	PAU211	3 - 8	56 - 61
20	249	.97	PAU522	3 - 7	56 - 60

Scoring sequence segments.

=====

JUNINMC2 56- AFKIGL

 :~::~:

PAU11 3- AFKIGL

JUNINMC2 56- AFKIGL

 :~::~:

PAU521 3- AFKIGL

JUNINMC2 56- AFKIGL

 :~::~:

PAU1011 3- AFKIGL

JUNINMC2	56- AFKIGL
	:::::
PAU1331	3- AFKIGL
JUNINMC2	249- FFSWSLT
	::: :::
PAU832	2- FFSXSLT
JUNINMC2	57- FKIGL
	:::::
PAU361	4- FKIGL
JUNINMC2	57- FKIGL
	:::::
PAU681	4- FKIGL
JUNINMC2	57- FKIGL
	:::::
PAU1171	4- FKIGL
JUNINMC2	57- FKIGL
	:::::
PAU1491	4- FKIGL
JUNINMC2	248- AFFSWSLT
	::: :::
PAU1602	1- AFFSKSLT
JUNINMC2	249- FFSWSL
	::: ::
PAU831	2- FFSXSL
JUNINMC2	249- FFSWSLT
	::: :::
PAU791	2- FFSKSLT
JUNINMC2	56- AFKIGL
	::: :::
PAU241	3- AFXIGL
JUNINMC2	56- AFKIGL
	::: :::
PAU561	3- AFXIGL
JUNINMC2	56- AFKIGL
	::: :::
PAU1051	3- AFXIGL
JUNINMC2	56- AFKIGL
	::: :::

PAU1371 3- AFXIGL

JUNINMC2 248- AFFSWSL

:::: ::

PAU1601 1- AFFSKSL

JUNINMC2 56- AFKIG

:::::

PAU12 3- AFKIG

JUNINMC2 56- AFKIGL

::: ::

PAU211 3- AFKSGL

JUNINMC2 56- AFKIG

:::::

PAU522 3- AFKIG

N° DE CICLO	AMINOACIDO	AMINOACIDO
1	Glutamato - E	Alanina - A
2	Glutamato - E	Fenilalanina - F
3	Alanina - A	Fenilalanina - F
4	Fenilalanina - F	Serina - S
5	Lisina - K	Indeterminado
6	Isoleucina - I	Serina - S
7	Glicina - G	Leucina - L
8	Leucina - L	Treonina - T
9	Indeterminado	Aspartato - D
10	Treonina - T	Serina - S
11	Glutamato - E	Serina - S
12	Prolina - P	Glicina - G
13	Glutamina - Q	Valina - V
14	Aspartato - D	Aspartato - D

Tabla IV.7: Secuencia Obtenida

Para cada uno de los ciclos se obtuvo 2 señales aminoacídicas, de igual intensidad. A partir del ciclo N° 15, se hizo muy difícil la asignación.

El aminoácido triptofano(W), se degrada luego del clivaje por lo que su detección es nula en todos los casos

3.5 ANALISIS DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS

La información de las secuencias de GPC de arenavirus se obtuvo del Swissprot. Cabe aclarar que se derivan de secuencia genómica y no de la secuencia proteica directa, a diferencia de los datos que se aportan en esta tesis. Las secuencias y la nomenclatura que se utilizará en los próximos esquemas comparativos, son los que se detallan en la tabla IV.8.

3.6 BUSQUEDA DE SIMILITUD DE LA SUBSECUENCIA PEPTIDICA

Un primer barrido de GP 38-1 y GP 38-2 sobre el genoma de GPC de los arenavirus de la tabla IV.8 se realizó utilizando la matriz de Dayhoff MDM-78. Los resultados, obtenidos por el método de Needleman & Wunsch (1970), se resumen en las tablas IV.9 y IV.10 y IV.11.

De acuerdo al tratamiento que realiza este método sólo son significativas las comparaciones con Junín MC₂ y Tacaribe para GP38-1.

La tabla IV.11A nos muestra que el péptido GP 38-1 presenta las mejores similitudes con Tacaribe, con 87,5% de puntaje relativo porcentual en la posición 59 a 72 y con Junín MC₂ con 85,8% en la posición 54 a 67. Cabe destacar que los primeros 11 lugares de la tabla, con valores entre 73,8% y

87,5% corresponden a Junín o Tacaribe con ligeros corrimientos dentro de la zona genómica correspondiente a los aa 52 a 74.

El mismo análisis se realiza para la subsecuencia peptídica GP 38-2. En la tabla IV.11B vemos que para esta subsecuencia todas las comparaciones son significativas, con excepción de la cepa GA 391 del virus de Lassa, indicando así, mayor grado de conservación genómica en esta zona con respecto a la anterior para los miembros del grupo como ya fue informado por otros autores (Weber & Buchmeier, 1988).

Virus	Locus	N° acceso	Referencia	Nomenclat.
LCM	VGLY_LYCVW	P07400 P07399 P14241	Romanowski & Bishop (1985) Romanowski et al (1985) Salvato et al (1988)	LCMWE
LCM	VGLY_LYCVA	P09992 P09991 P14240 P18541	Singh et al (1987) Salvato & Shimomaye (1989)	LCMARMSTR
Lassa	VGLY_LASSG	P04935 P17332	Clegg & Oram (1985) Clegg et al (1990)	LASSAGA391
Lassa	VGLY_LASSJ	P13699 P08669	Aupering & McCormick (1989) Auperin et al (1986)	LASSAJOS
Mopeia		P19239 P19240	Wilson & Clegg (1991) Clegg & Oram (1985)	
Pichinde	VGLY_PJARV	P03540 P03541	Auperin et al (1984)	PICHINDE
Tacaribe	VGLY_TACV	P18140 P18181 P20430 a	Franze-Fernandez et al (1987) Iapalucci et al (1989a) Iapalucci et al (1989b)	TACARIBE
Junín	VGLY_JUNIN	P14239 P26313	Ghiringhelli et al (1989) Ghiringhelli et al (1991)	JUNINMC2

Tabla IV.7: Nomenclatura adoptada para la comparación con otras secuencias publicadas.

Nb	Absolute score	Relative score (%)	Sequence code	Position From	To
1	1353	94.8	GP38_1	1 to	14
2	1249	87.5	TACARIBE	59 to	72
3	1224	85.8	JUNINMC2	54 to	67
4	1170	82.0	JUNINMC2	55 to	68
5	1155	80.9	TACARIBE	58 to	71
6	1151	80.7	TACARIBE	60 to	73
7	1125	78.8	JUNINMC2	53 to	66
8	1121	78.6	JUNINMC2	56 to	69
9	1063	74.5	JUNINMC2	52 to	65
10	1055	73.9	TACARIBE	57 to	70
11	1053	73.8	TACARIBE	61 to	74
12	1048	73.4	PICHINDE	16 to	29
13	1043	73.1	JUNINMC2	57 to	70
14	1041	73	TACARIBE	56 to	69
15	1028	72.0	PICHINDE	15 to	28
16	1027	72.0	JUNINMC2	16 to	29
17	1027	72.0	TACARIBE	16 to	29
18	1024	71.8	PICHINDE	410 to	423
19	1022	71.6	LASSAGA391	395 to	408
20	1020	71.5	LASSAJOS	396 to	409
21	1015	71.1	JUNINMC2	51 to	64
22	1015	71.1	LCMARMSTR	402 to	415
23	1015	71.1	LCMWE	402 to	415
24	1011	70.8	JUNINMC2	101 to	114
25	1006	70.5	LCMWE	340 to	353
26	1005	70.4	JUNINMC2	185 to	198
27	999	70.0	PICHINDE	422 to	435
28	991	69.4	JUNINMC2	15 to	28
29	991	69.4	JUNINMC2	100 to	113
30	991	69.4	TACARIBE	15 to	28
31	989	69.3	JUNINMC2	166 to	179
32	989	69.3	TACARIBE	105 to	118
33	987	69.2	PICHINDE	14 to	27
34	985	69.0	LASSAGA391	328 to	341
35	985	69.0	LASSAJOS	329 to	342
36	982	68.8	TACARIBE	55 to	68
37	981	68.7	TACARIBE	62 to	75
38	980	68.7	LCMWE	341 to	354
39	977	68.5	JUNINMC2	181 to	194
40	969	67.9	TACARIBE	104 to	117
41	965	67.6	LCMARMSTR	242 to	255
42	963	67.5	PICHINDE	17 to	30
43	963	67.5	TACARIBE	150 to	163
44	956	67.0	LCMARMSTR	131 to	144
45	956	67.0	LCMWE	166 to	179
46	956	67.0	LCMWE	167 to	180
47	955	66.9	LCMWE	131 to	144
48	952	66.7	LASSAJOS	100 to	113
49	951	66.6	TACARIBE	138 to	151
50	950	66.6	JUNINMC2	99 to	112

Tabla IV.9: Barrido de similitud de la subsecuencia peptídica

GP 38-1.

Nb	Absolute score	Relative score (%)	Sequence code	Position From	To
1	1358	100	GP38_2	1	14
2	1291	95.0	JUNINMC2	248	261
3	1242	91.4	TACARIBE	262	275
4	1230	90.5	PICHINDE	274	287
5	1213	89.3	JUNINMC2	249	262
6	1207	88.8	LCMARMSTR	266	279
7	1207	88.8	LCMWE	266	279
8	1192	87.7	JUNINMC2	247	260
9	1164	85.7	TACARIBE	263	276
10	1163	85.6	PICHINDE	273	286
11	1157	85.1	PICHINDE	275	288
12	1156	85.1	JUNINMC2	246	259
13	1148	84.5	TACARIBE	261	274
14	1134	83.5	LCMARMSTR	267	280
15	1134	83.5	LCMWE	267	280
16	1131	83.2	LASSAGA391	259	272
17	1129	83.1	LASSAJOS	260	273
18	1122	82.6	PICHINDE	272	285
19	1113	81.9	LCMARMSTR	265	278
20	1113	81.9	LCMWE	265	278
21	1105	81.3	TACARIBE	260	273
22	1105	81.3	LCMARMSTR	268	281
23	1105	81.3	LCMWE	268	281
24	1062	78.2	JUNINMC2	250	263
25	1058	77.9	LASSAGA391	260	273
26	1056	77.7	LASSAJOS	261	274
27	1055	77.6	PICHINDE	93	106
28	1048	77.1	JUNINMC2	245	258
29	1037	76.3	LASSAGA391	258	271
30	1030	75.8	LASSAJOS	259	272
31	1029	75.7	JUNINMC2	168	181
32	1029	75.7	JUNINMC2	427	440
33	1029	75.7	LASSAGA391	261	274
34	1027	75.6	LASSAJOS	262	275
35	1018	74.9	LCMWE	82	95
36	1017	74.8	JUNINMC2	428	441
37	1015	74.7	LCMARMSTR	258	271
38	1014	74.6	PICHINDE	271	284
39	1013	74.5	TACARIBE	264	277
40	1010	74.3	LCMARMSTR	264	277
41	1010	74.3	LCMWE	264	277
42	1009	74.3	PICHINDE	94	107
43	1006	74.0	PICHINDE	276	289
44	1002	73.7	LASSAJOS	101	114
45	997	73.4	TACARIBE	259	272
46	994	73.1	LASSAGA391	257	270
47	994	73.1	LASSAJOS	258	271
48	989	72.8	JUNINMC2	157	170
49	986	72.6	PICHINDE	357	370
50	984	72.4	LASSAGA391	100	113

Tabla IV.10: Barrido de similitud de la subsecuencia peptídica

GP 38-2.

A			
Nb	Ascore	Sequence name	
1	8.76	GP38_1	<*>
2	5.698	TACARIBE	<*>
3	4.583	JUNINMC2	<*>
4	1.19	PICHINDE	
5	-.174	LASSAJOS	
6	-.415	LASSAGA391	
7	-.692	LCMWE	
8	-1.704	LCMARMSTR	

B			
Nb	Ascore	Sequence name	
1	12.086	LCMARMSTR	<*>
2	9.364	JUNINMC2	<*>
3	5.305	LCMWE	<*>
4	5.25	GP38_2	<*>
5	4.696	PICHINDE	<*>
6	4.14	TACARIBE	<*>
7	3.758	LASSAJOS	<*>
8	2.199	LASSAGA391	

:indica un resultado significativo (por arriba de 3).

Tabla IV.11: Tabla de puntajes significativos para el programa de barrido de similitud. (Scansim)

Bias {B}:60

Penalidad por hiato {P}:60

A-contra GP 38-1

B-contra GP 38-2

3.6.1 ALINEAMIENTO MULTIPLE DE SECUENCIAS

Se analizaron las subsecuencias de GP 38 mediante alineamientos múltiples usando el programa Clustal (Higgins & Sharp, 1988, 1989).

En la figura IV.22.A mostramos el alineamiento de GP 38-1 y en la figura IV.22.B el de GP 38-2, pero solamente en la zona donde el barrido encontró mayor homología con cada uno de los virus mencionados y en la tabla IV.12 se muestra el número de aa concordantes con cada arenavirus sobre el total de los 14 aa analizados.

A

JUNIN	-scpr-afkiglhtevpdcv	18
PICHI	-scd-----smnidrrh--	11
LCMAR	-scg--myglkgpdiykgvy	17
LCMW	-scg--myglngpdiykgvy	17
TACAR	-scseetfkigmhtkfgev-	18
GP38_1	----eeafkiglxtepqd--	14
LASSA	-scsl-iyk-----gty	10
LASSAJ	rscttslyk-----gvy	12

B

JU	LKAFFSWSLTDSSGKDTP	18
TACA	LKAFFSWSLTDPLGNEAP	18
GP38_2	--AFFSXSLTDSSGVD--	14
LASG	LLGTFTWTLSDSEGNETP	18
LASJ	LLGTFTWTLSDSEGKDTP	18
LCMA	LAGTFTWTLSDSSGVENP	18
LCMWE	LSGTFTWTLSDSSGVENP	18
PICH	LLGFFTWDLSDSSGQHVP	18

Figura IV.22: Alineamiento múltiple de secuencias.

Se realizó sobre la zona donde el barrido mostró la mejor homología.

A-alineamiento de GP 38-1

B-alineamiento de GP 38-2

	GP 38-1	GP 38-2
Junín MC ₂	9	12
Tacaribe	8	9
Pichinde	5	7
LCM WE	4	7
LCM ARMSTR	4	7
Lassa S05	4	6
Lassa A391	4	5

Tabla IV.12: Similitud de secuencia aminoacídica de GP 38-1 y GP 38-2 sobre un total de 14 aa.

Se observa en todos los casos mayor homología para GP 38-2 que para GP 38-1, con más proximidad a Junín y a Tacaribe y en menor proporción a los arenavirus agrupados como los del "viejo mundo".

La degradación de Edman destruye el aa triptofano después del clivaje por lo que la similitud para GP 38-2 se elevaría en 1 en la comparación con todas las secuencias, si asumimos que la X corresponde al triptofano degradado.

Esto se representa claramente en los dendogramas figura IV.23 y figura IV.24 donde se incluyen para su comparación las subsecuencias GP 38-1 y GP 38-2.

Alineados de a dos secuencias proteicas con el método Palign de Myers & Miller (1988) (asignando un costo de 7 por abrir un hiato y costo unitario de 1 por cada hiato), podemos ver en la figura IV.25A y B una identidad del 85,71% entre GP 38-2 con Junín MC₂ y del 64,29% comparada contra Tacaribe.

Para la secuencia GP 38-1 estos valores descienden a 64,29% contra Junín MC₂ y del 57,14% contra Tacaribe (Fig IV.26A y B).

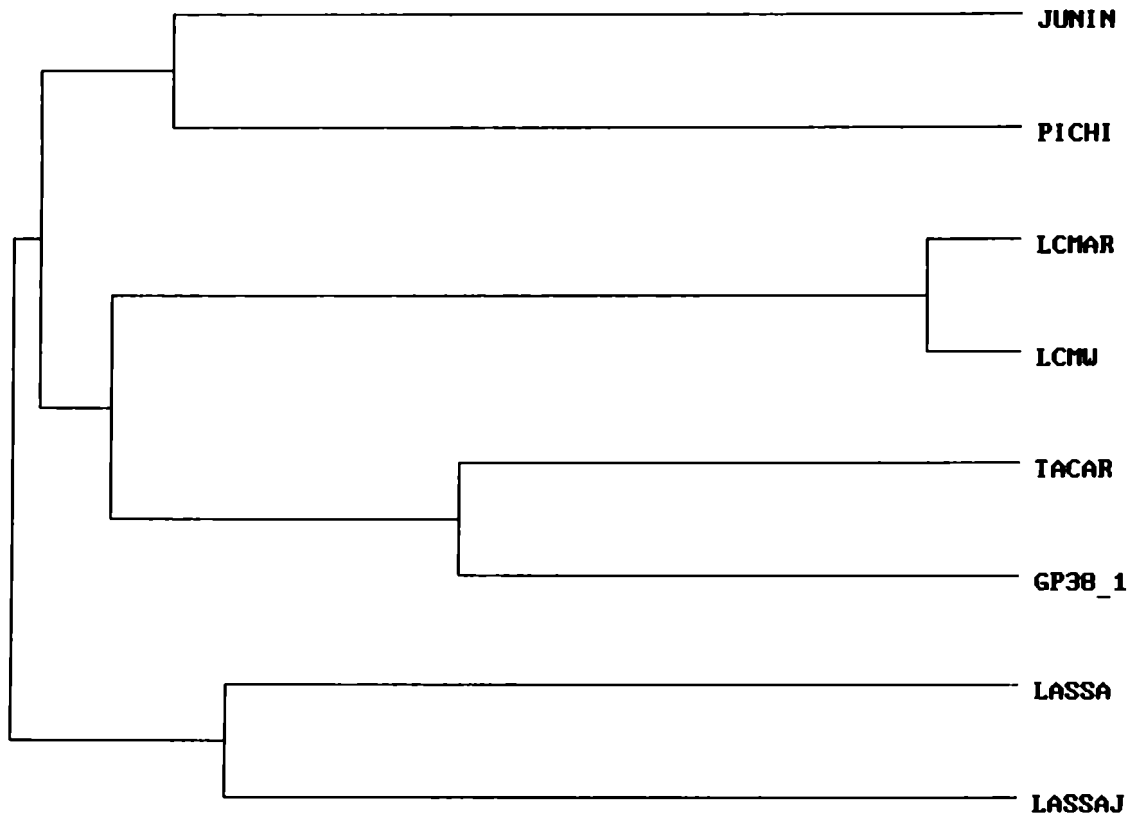


Figura IV.23: Dendograma del alineamiento de GP38-1

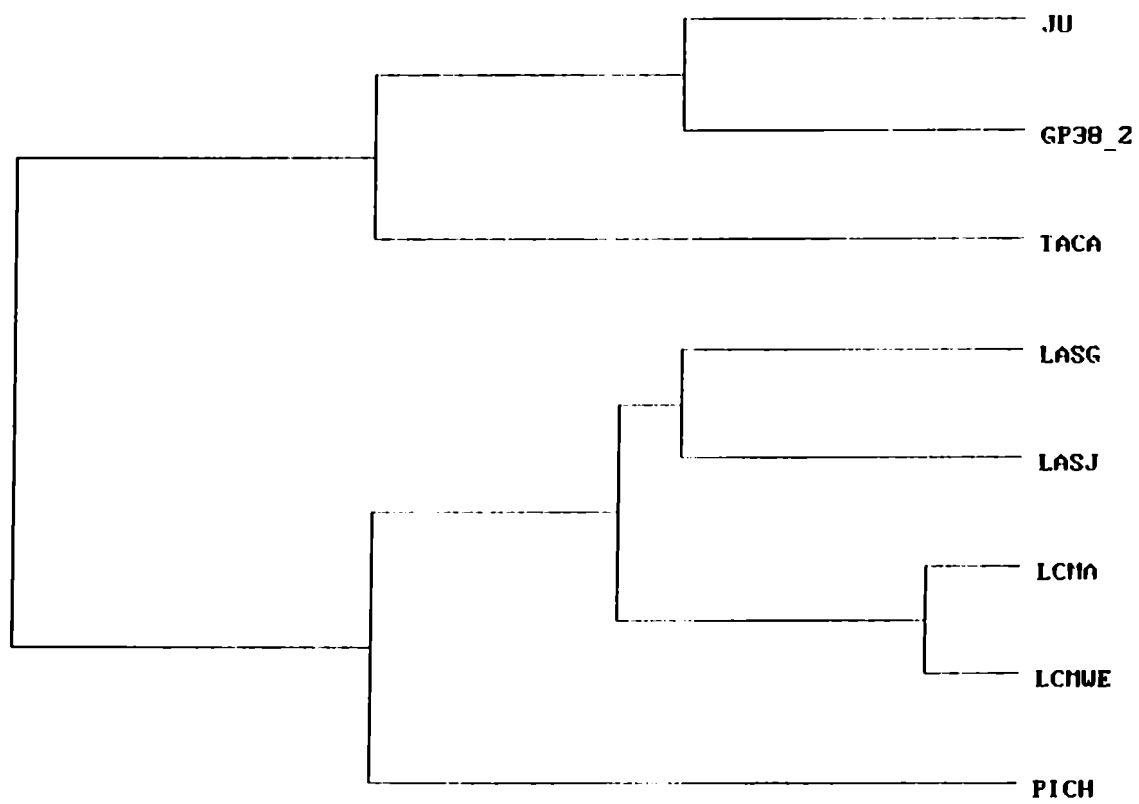


Figura IV.24: Dendograma del alineamiento de GP38-2

```

GP38_1      - EE----- -2
JUNINMC2   - MGQFISFMQEIP TFLQEALNIALVAVSLIAI IKGVVNLKSGCSILDLAG -50
GP38_1      - -----AFKIGLXTEPQD -14
              ||| ||| |
JUNINMC2   - RSCPRAF KIGLHTEVPDCVLLQWWVSFSNNPHDLPLLCTLNKSHLYIKGG -100
JUNINMC2   - NASFKISFDDIAVLLPEYDVIIQHPADMSWCSKSDQIRLSQWFMNAVGH -150
JUNINMC2   - DWYLDPPFLCRNRTKTEGFIFQVNTSKTGINENYAKKFKTGMHHL YREYP -200
JUNINMC2   - DSCLDGKLC LMKAQPTSWPLQCPLDHVNTLHFLTRGKNIQLPRRSLKAFF -250
JUNINMC2   - SWSLTDSSGKDT PGGYCLEEWMLVAAKMKCFGNTAVAKCNLNHDSEFCDM -300
JUNINMC2   - LRLF DYNKNAIKTLNDETKKQVNL MGQT1NALISDNLLMKNKIRELMSVP -350
JUNINMC2   - YCNYTKFWYVNHTLSGQHS LPRCWLIKNN SYLNISDFRNDWILESDFLIS -400
JUNINMC2   - EMLSKEYSDRQ GK TPLTLVDICFWSTVFF TASF LHLVGIPTHRHIRGEA -450
JUNINMC2   - CPLPHRLNSLGGCRCGKYPNLKKPTVWRRGH -481

```

```

Identity   : 9 (64.29%)
Number of  gaps inserted in GP38_1: 1
Number of  gaps inserted in JUNINMC2: 0

```

| indica que los 2 residuos alineados son idénticos.

Figura IV.25A: Alineamiento de la subsecuencia peptídica GP 38-1 con el VJ.

Costo por abrir hiato:7

Costo unitario por hiato:1

```

TACARIBE - MGQFISFMQEIPIFLQEALNIALVAVSLICIVKGLVNLVRCGLFQLMVFL -50
GP38_1      EEAFKIGLXTEPQD -14
           || ||||| | |
TACARIBE - VLAGRSCSEETFKIGMHTKFQEVSLSLALLTNQSHELPMLCLANKTHLY -100
TACARIBE - LKSGRSSFKINIDSVTVLTRSEVNLTSINLTRSIDVHVHSPKLGSCFESD -150
TACARIBE - EEWVVAWWIEAIGHRWQDPGLLCRNKTKTEGKLIQINISRADGNVHYGW -200
TACARIBE - RLKNGLDHIYRGREEPCFEGEQCLIKIQPEDWPTDCKADHTNTFRFLSRS -250
TACARIBE - QKSIAVGRTLKAFFSWSLTDPLGNEAPGGYCLEKWMLVASELKCFGNTAI -300
TACARIBE - AKCNQNHDFCDMLRRLFDYNKNAIKTLNEETKTRVNVLSHTINALISDN -350
TACARIBE - LLMKNKIRELMSVPYCNYTRFWYVNHTLSGQHS�PRCWMIRNNSYLSSE -400
TACARIBE - FRNEWILESDFLISEMLGKEYSERQGRTPITLVDICFWSTVFFTSTLFLH -450
TACARIBE - LIGFPTHEHIRGEGCPLPHRLNSMGGCRGKYLPLKKPTIWRRRH -495

```

Identity : 8 (57.14%)
Number of gaps inserted in GP38_1: 0
Number of gaps inserted in TACARIBE: 0

| indica que los 2 residuos alineados son idénticos.

Figura IV.25B: Alineamiento de la subsecuencia peptídica GP 38-1 con TAC.

Costo por abrir hiato:7

Costo unitario por hiato:1


```

TACARIBE - MGQFISFMQEIPIFLQEALNIALVAVSLICIVKGLVNLVYRCGLFQLMVFL -50
TACARIBE - VLAGRSCSEETFKIGMHTKFQEVSLSLALLTNQSHHELPMLCLANKTHLY -100
TACARIBE - LKSGRSSFKINIDSVTLTRSEVNLTSINLTRSIDVHVHSPKLGSCFESD -150
TACARIBE - EEWVVAWWIEAIGHRWDPGLLCRNKTKTEGKLIQINISRADGNVHYGW -200
TACARIBE - RLKNGLDHIYRGREEPCFEQEQLIKIQPEDWPTDCKADHTNTFRFLSRS -250
GP38_2      AFSXSLTDSSGVD -14
            ||||| ||||| |
TACARIBE - QKSIAVGRTLKAFFSWSLTDPLGNEAPGGYCLEKWMLVASELKCFGNTAI -300
TACARIBE - AKCNQNHDFCDMLRFLFDYNKNAIKTLNEETKTRVNVLSHTINALISDN -350
TACARIBE - LLMKNKIRELMSVPYCNYTRFWYVNHTLSGQHS�PCWMIRNNSYLNSSE -400
TACARIBE - FRNEWILESDFLISEMLGKEYSERQGRTPITLVDICFWSTVFFFTSTLFLH -450
TACARIBE - LIGFPTHEHIRGEGCPLPHRLNSMGGCRCGKYLPLKKPTIWHRRH -495

```

```

Identity : 9 (64.29%)
Number of gaps inserted in GP38_2: 0
Number of gaps inserted in TACARIBE: 0

```

| indica que los 2 residuos alineados son idénticos.

**Figura IV.26B: Alineamiento de la subsecuencia peptídica GP
38-2 con TAC.**

Costo por abrir hiato:7

Costo unitario por hiato:1

3.7 PREDICCIÓN DE SEPARACIÓN DE GP 38-1 DE GP 38-2 POR PUNTO ISOELECTRICO.

Como información complementaria, y con el propósito de evaluar un método de aislamiento de las proteínas GP 38-1 y GP 38-2, se computó la carga proteica en función del pH empleando el programa Chargpro, incluido en el programa PC/Gene, para GP-1 y GP-2 según la secuencia nucleotídica publicada (Ghiringhelli et al 1991) convertida a aa, utilizando como aa de corte el 247-248 obtenido en nuestra secuenciación. En la figura IV.27 se observa un punto isoeléctrico de 8,22 para GP-1, teniendo en cuenta los aa 1 a 247, y de 8,63 para la fracción entre 248 a 481 o sea GP-2.

Estos valores dificultarían mucho la resolución de ambas proteínas en un gel electroenfocado, sin embargo el número de asparaginas y glutaminas deamidadas que no se tuvieron en cuenta en este cómputo, por no conocerse los sitios de glicosilación efectivamente utilizados, podría cambiar notablemente los puntos isoeléctricos de una o ambas proteínas.

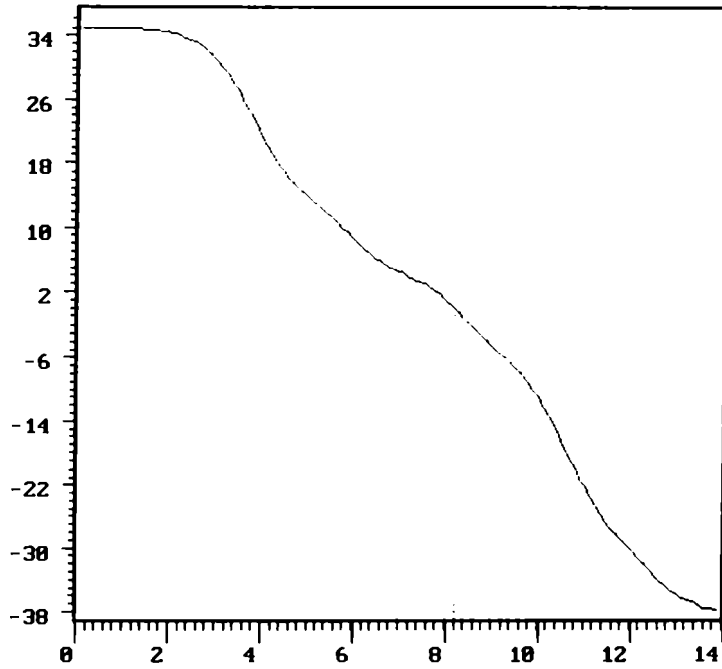
Residues and pK values taken in account in the computation.

N-ter (+) Met, pK: 9.21
C-ter (-) Lys, pK: 2.16

Arg (+) 9, pK: 12.48
Lys (+) 16, pK: 10.79
His (+) 9, pK: 6

Asp (-) 14, pK: 3.65
Glu (-) 7, pK: 4.25
Cys (-) 9, pK: 8.35
Tyr (-) 7, pK: 10.13

Isoelectric point: 8.22



Curve of the charge of protein JUNINMC2 as a function of the pH (from 0 to 14). Calculated for a fragment, from amino acid 1 to 247.

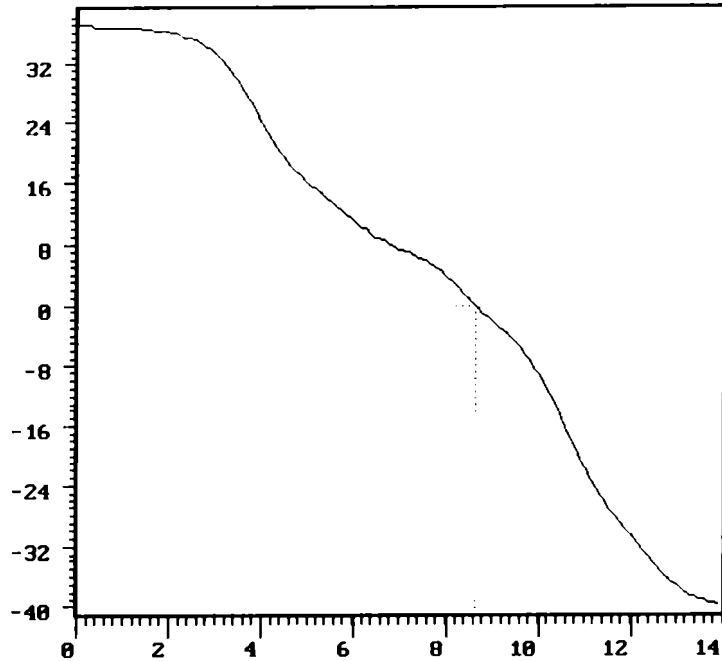
Residues and pK values taken in account in the computation.

N-ter (+) Ala, pK: 9.69
C-ter (-) His, pK: 1.82

Arg (+) 11, pK: 12.48
Lys (+) 17, pK: 10.79
His (+) 8, pK: 6

Asp (-) 12, pK: 3.65
Glu (-) 9, pK: 4.25
Cys (-) 10, pK: 8.35
Tyr (-) 8, pK: 10.13

Isoelectric point: 8.63



Curve of the charge of protein JUNINMC2 as a function of the pH (from 0 to 14). Calculated for a fragment, from amino acid 248 to 481.

Figura IV.27: Curva de la carga de las proteínas GP 38-1 y GP 38-2 en función del pH.

3.7 CONCLUSIONES

Si bien el número de aa secuenciados es muy bajo debido a la dificultad de asignación por doble señal, los datos presentados en este capítulo, nos permitirían demostrar que las glicoproteínas estructurales del virus Junín comigran en el gel de proteínas de la misma forma que fuera ya informado para el virus Tacaribe.

Según nuestros resultados, el sitio de corte de la enzima en el precursor para obtener GP38-1 y GP38-2 se halla entre la lisina 247 y la alanina 248 según la numeración de Ghiringhelli et al., (1991). De este modo Ala 248 sería el primer aa de GP38-2, y Glu 54 para GP38-1.

La GP38-2 es más conservada que la GP38-1. Sobre 14 aa secuenciados podemos asignar identidad en 12, pero, si consideramos que en triptofano no se obtiene señal ya que este aa se destruye en la degradación de Edman, podríamos considerar una identidad de 13 aa, lo que elevaría el puntaje porcentual de 85 a 92,85.

4. CARACTERIZACION TOPOLOGICA

El virus Junín está compuesto de una envoltura externa y estructuras ribonucleoproteicas denominadas nucleocápsides. La envoltura externa se adquiere por un proceso de brotación de la superficie de la célula huésped. Hasta el momento hemos definido dos glicoproteínas estructurales de envoltura de aproximadamente igual peso molecular, pero sin determinar aún la relación espacial de las proteínas virales en la partícula madura y el papel que ésta puede jugar en el ensamblado viral y en los estadios que se suceden en el proceso infectivo.

La relación espacial de las proteínas individuales en la partícula viral se ha determinado en diversos sistemas, analizando los complejos proteicos presentes, como resultado de uniones disulfuro nativas o inducidas, o uniones formadas por agentes químicos que actúan como agentes de crosslinking (Burns & Buchmeier, 1991). Los polipéptidos que están suficientemente entrecruzados en grandes complejos, indican que ellos gozan de abundantes contactos con las moléculas proteicas vecinas.

Las glicoproteínas de virus envueltos pueden estar asociados a la bicapa lipídica como proteínas periféricas o como proteínas de transmembrana. En la bicapa por lo tanto podemos distinguir más de un dominio proteico. Uno hidrofílico, ex-

puesto fuera de la membrana, otro hidrofóbico insertado en la misma y en algunos casos existe un tercer dominio que se proyecta dentro de la partícula constituyendo así una proteína de transmembrana.

4.1 EFECTO DE ENZIMAS PROTEOLITICAS

El tratamiento de las partículas virales con enzimas proteolíticas elimina el componente hidrofílico de las glicoproteínas y su empleo en este trabajo nos permitirá conocer la interacción virus-célula y su asociación con otros constituyentes de la envoltura viral.

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando virus purificado por doble colchón de sacarosa y marcado "in vivo" con aminoácidos [^{14}C] o con glucosamina [^{14}C]. La banda de virus, así purificado, se concentró por ultracentrifugación con el fin de eliminar sacarosa, por ser este azúcar un inhibidor de la actividad enzimática. Un sólo experimento se realizó dializando el purificado viral contra buffer borato, previo al tratamiento enzimático. Sin embargo, el método de concentración por ultracentrifugación resultó más efectivo en cuanto a la recuperación de masa de virus. El pellet se resuspendió en buffer y se incubó con α -quimiotripsina o pronasa durante 1h a 37°C .

En la tabla IV.13 se puede observar la pérdida de infectividad sufrida por el virus después del tratamiento enzimático.

Tabla IV.13: Efecto de enzimas proteolíticas en la infectividad viral.

TRATAMIENTO	TITULO INFECTIVO DL ₅₀ /0,02ml
—————	10 ^{6,0}
α-QUIMIOTRIPSINA 1 mg/ml	10 ^{2,0}
PRONASA 0,1 mg/ml	10 ^{3,5}

La α-quimiotripsina disminuyó el título infectivo en 4 log en tanto que la pronasa produjo una reducción aproximada de 2.5 log.

Luego de la digestión enzimática las muestras fueron purificadas en un gradiente de densidad continuo de sacarosa. Se puede observar en la figura IV.28 y IV.29, que las muestras tratadas experimentaron una disminución también en el coeficiente de sedimentación.

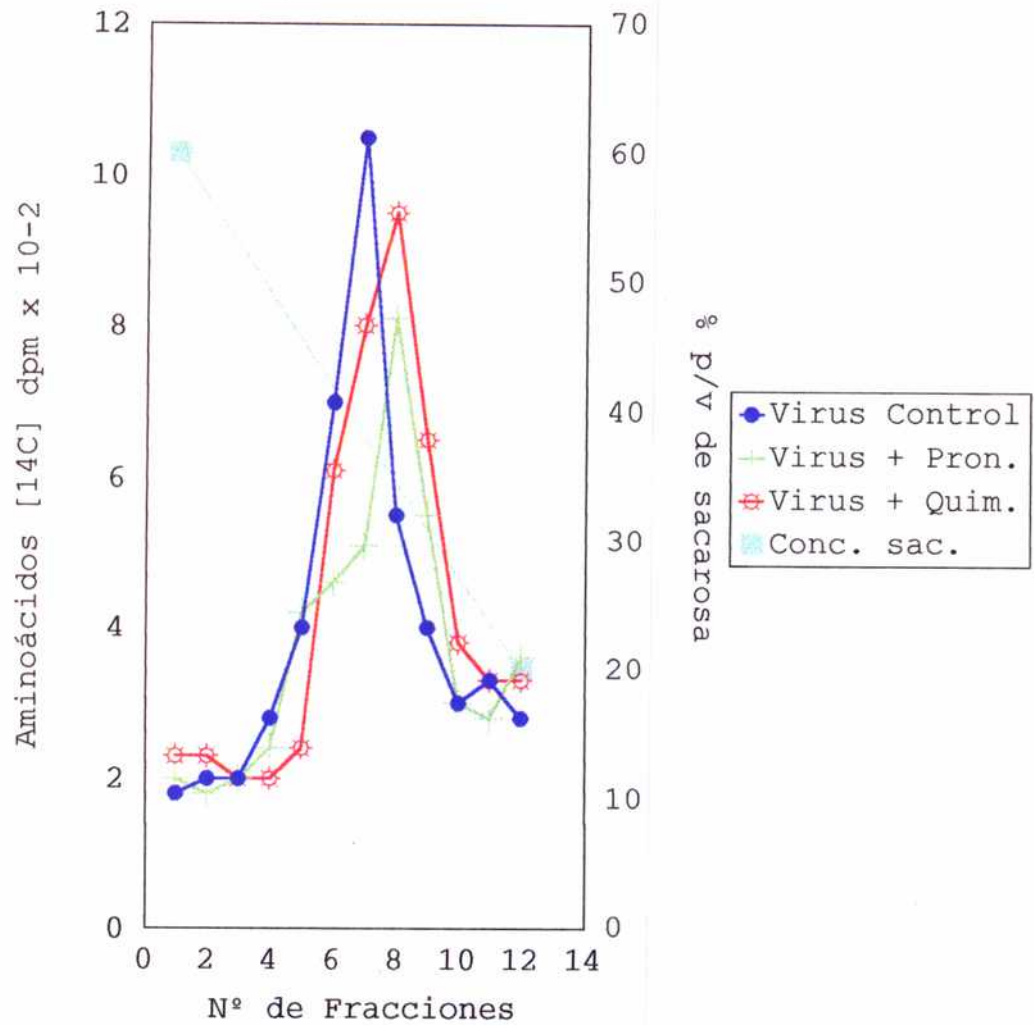


Figura IV.28: Perfil proteico de los viriones purificados

luego del tratamiento con enzimas proteolíticas.

El fluido viral de células BHK₂₁, marcado con precursores radioactivos, purificado por doble colchón de sacarosa y pelletado, se resuspendió en buffer BO₃Na₃ pH 7,2. Luego se trató durante 1h a 37°C y se purificó por gradiente continuo de sacarosa.

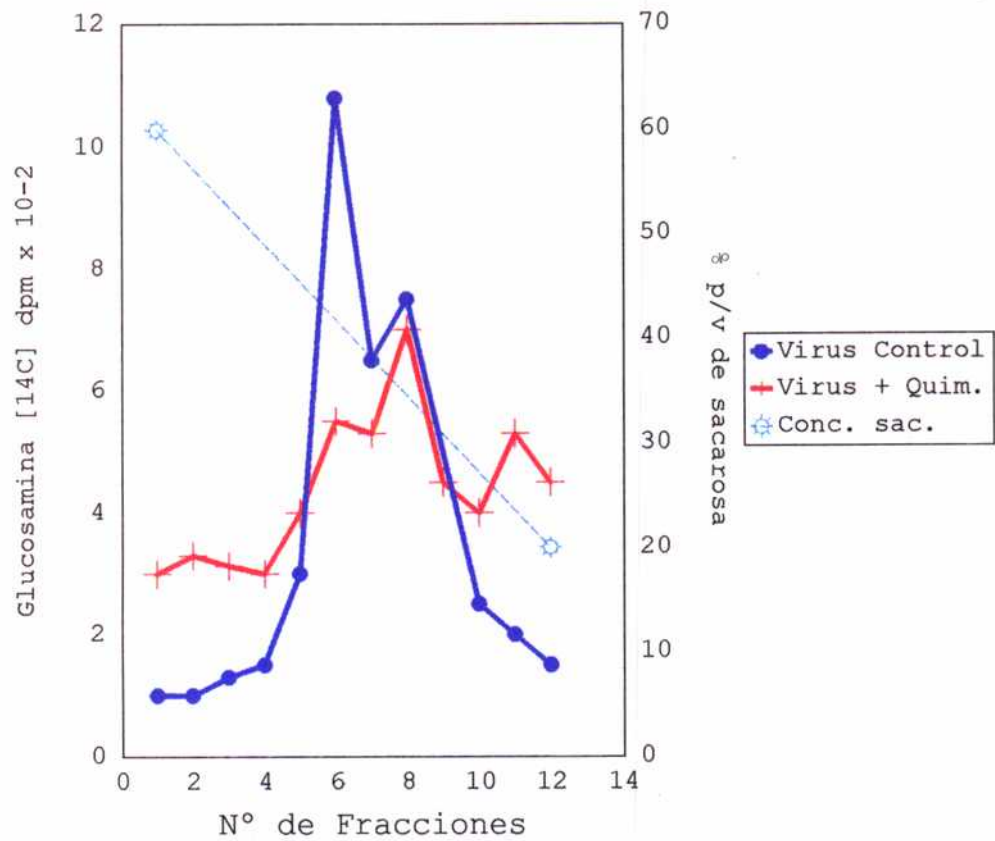


Figura IV.29: Perfil glicoproteico de los viriones purificados luego del tratamiento con enzimas proteolíticas.

El fluido viral de células BHK₂₁, marcado con precursores radioactivos, purificado por doble colchón de sacarosa y pelleteado, se resuspendió en buffer BO₃Na₃ pH 7,2. Luego se trató durante 1h a 37°C y se purificó por gradiente continuo de sacarosa.

Los picos de los gradientes se concentraron, esta vez con el fin de disminuir su volumen y poder así analizar las proteínas en geles.

Nuestros resultados obtenidos por digestión del virus Junín con quimiotripsina demuestran que la integridad de ambas glicoproteínas GP-1 y GP-2, son esenciales para la infectividad, ya que el análisis electroforético de las proteínas (Fig IV.30) reveló que solamente fue degradada la banda de 38 kDa, donde comigran GP38-1 y GP38-2 dejando sin embargo, fragmentos lipofílicos menores embebidos en la matriz de la envoltura.

Estos resultados sugieren que las glicoproteínas Gp38 poseen una región hidrofílica glicosilada la cual se proyecta fuera de la envoltura viral, una porción hidrofóbica la cual se extiende a través de la membrana y como luego va a ser descrito existiría un tercer dominio el cual se proyecta hacia el interior de la partícula.

En resumen hasta el momento podemos atribuir a las glicoproteínas GP-1 y GP-2, dos funciones biológicas: producir anticuerpos en un huésped y por otra parte servir como el principal sitio de unión del virus a la superficie celular.

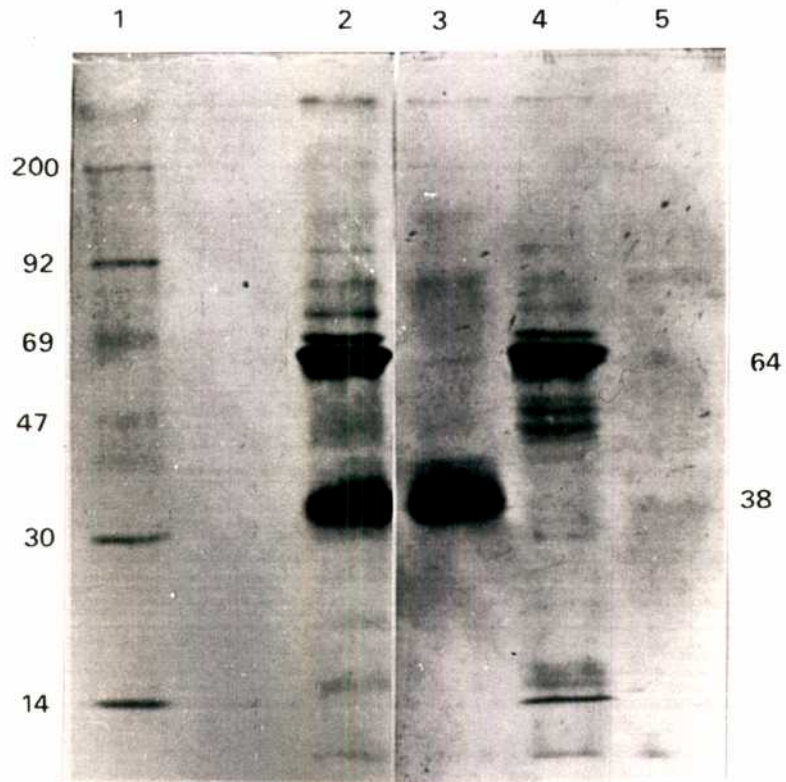


Figura IV.30: Análisis electroforético de los viriones tratados con α -quimiotripsina.

Los picos de máxima radioactividad fueron concentrados por ultracentrifugación y sembrados en un gel de PAA-SDS al 10%.

Calle 1- Control de PM.

Calle 2- Proteínas virales.

Calle 3- Glicoproteínas virales.

Calle 4- Proteínas virales tratadas con α -quimiotripsina.

Calle 5- Glicoproteínas virales tratadas con α -quimiotripsina.

4.2 EFECTO DE AGENTES DE ENTRECruzAMIENTO

Nos propusimos en esta sección investigar la arquitectura de las glicoproteínas GP-1 y GP-2, en relación a su parte expuesta interna, aprovechando estudios de entrecruzamiento conocidos como "cross-linking" que en nuestro laboratorio se estaban llevando a cabo con el fin de obtener una vacuna inactivada.

Estos trabajos mostraron que el sobrenadante de un homogenato de cerebro de ratón lactante infectado e inactivado por oxidación fotodinámica en presencia de un colorante heterocíclico, como el azul de metileno, en condiciones controladas, resulta en la obtención de un antígeno inmunizante para el cobayo (Martínez Segovia et al., 1980).

Al estudiar el mecanismo que opera en dicha inactivación se encontró que existe una marcada disminución en la eficiencia de extracción del RNA, por formación de un complejo RNA con las proteínas virales. (Fernandez Cobo et al., 1982) impidiendo que el ácido nucleico se exprese.

Diseñamos un experimento de entrecruzamiento que permita detectar si existen uniones entre las glicoproteínas y los componentes internos del virión separando el complejo formado

mediante gel de PAA-SDS y elución de la banda que no penetra en el gel para su análisis.

El virus Junín purificado y fotoinactivado en la forma habitual fue ultracentrifugado y resuspendido en buffer tris-HCl en presencia de 0,5% de SDS y la mitad de la muestra fue tratada con azul de metileno (preincubada a 37° por 2 hs.) e incubada junto con el virus control a 37°C durante 1h.

La muestra tratada y control se analizó en un gel de PAA-SDS (Fig.IV.31A) y la banda radioactiva que no penetró el gel fue cortada y eluída con buffer tris-acetato de sodio en presencia de MFSF. El sobrenadante de una centrifugación a 5.000 xg durante 10 min fue precipitado con etanol y ultracentrifugado a 10.000 xg 30 min. El pellet resuspendido en buffer-tris HCl en presencia de MFSF se trató con RNasa pancreática a 37° 1h. La reacción se detuvo por el agregado de 2- mercaptoetanol y SDS. Las muestras se analizaron en geles de PAA_SDS.

Se puede observar en la figura IV.31B que se liberan del complejo RNA-proteína por tratamiento con Rnasa, la NP 64 y GP 38, sin poder diferenciar por este experimento si se trata de GP 38-1 o de GP 38-2. Sin embargo nos permite suponer que la NP 64 se encuentra en contacto con alguna de las dos glicoproteínas.

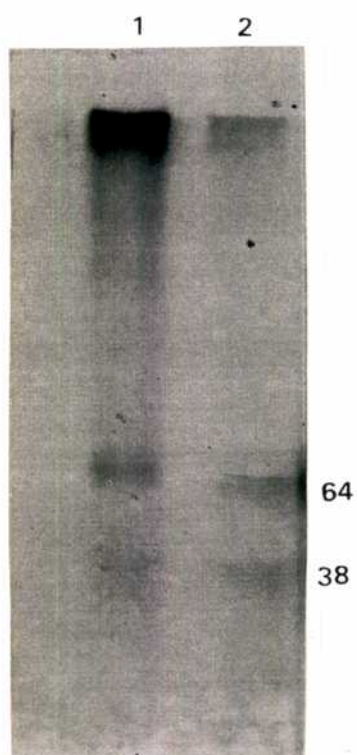


Figura IV.26: Análisis de las proteínas que forman el complejo RNA-proteína.

A-Viriones purificados fueron tratados con colorante y analizadas sus proteínas en un gel de PAA-SDS al 10%.

Calle 1- Virus tratado con azul de metileno.

Calle 2- La banda que no penetró en el gel (de una calle paralela e idéntica a la calle 1), se cortó, trató con RNAsa y se sembró en un gel de PAA-SDS al 10%.

DISCUSSION

V. DISCUSION

El análisis de la composición proteica de varios arenavirus ha establecido un patrón de 2 o 3 proteínas mayores, un polipéptido de nucleocápside no glicosilado y una o dos glicoproteínas. Grau et al. (1981), informaron para las cepas MC₂ y XJCl₃ del virus Junín dos polipéptidos glicosilados de alrededor de 39 y 34 kDa, y en algunas preparaciones virales, en lugar de dos bandas, una única y ancha en la región de entre 39 y 34 kDa, proponiendo los autores que pudiera deberse a diferente grado de glicosilación, como ya se había comunicado para otros arenavirus (Buchmeier & Oldstone, 1979).

La presencia de dos glicoproteínas es discutida porque no se encuentra regularmente en todas las preparaciones de VJ. En estudios usando glucosamina radioactiva en células infectadas, se demostró que Gp38 es la glicoproteína más pesada (Damonte et al., 1985) y también se vió por iodinación que Gp38 es la única glicoproteína expresada en la superficie viral (Mersich et al., 1988).

Por los resultados obtenidos en este trabajo de tesis podemos concluir que esta banda ancha de 34-38 kDa, se debe a la comigración de las dos glicoproteínas codificadas por el fragmento S del virus, y no es debida a glicosilación diferencial de un mismo polipéptido.

Los resultados de caracterización biológica nos llevaron a concluir que la banda de 38 kDa, es la responsable de la producción de anticuerpos neutralizantes y de proteger a los cobayos contra la descarga de virus salvaje. Por otro lado cuando purificamos y aislamos esta proteína para su microse- cuenciación, nos encontramos con una doble lectura del aminoá- cido terminal coincidiendo, en un caso, claramente con GP-2, es decir, la porción del extremo carboxi-terminal del precur- sor GPC, y con una señal paralela de igual intensidad identi- ficamos también a GP-1, la porción amino terminal de GPC. Es- tos resultados no nos permiten determinar cual de las dos pro- teínas es la responsable de la actividad inmunogénica mencio- nada anteriormente.

Por un lado, para el virus TAC existe consenso entre los autores en la obtención de una sola proteína "G" estructural, producto de GPC (Gard et al., 1977; Boersma et al., 1982). Sin embargo el empleo de sueros monoespecíficos dirigidos contra dos porciones distintas de la proteína GPC, permitió detectar la existencia de dos GPC, de PM muy similares (Iapalucci et al., 1994).

Al tiempo de escritura de esta tesis se publicaron comu- nicaciones personales o manuscritos en preparación indicando que la glicoproteína "G" de TAC durante 3 degradaciones de

Edman distintas, da como resultado mezcla de dos polipéptidos (Glycoproteins of the arenavirus in *The Arenaviridae*, María S. Salvato, 1993). Estos datos no han sido publicados hasta el momento.

El virus Junín y el virus TAC fueron aislados de regiones geográficas muy distantes y de huéspedes naturales totalmente diferentes. Sin embargo existe una fuerte relación antigénica entre las glicoproteínas de envoltura de ambos virus. Tanto los cobayos como los monos marmoset inoculados con TAC están protegidos contra la descarga de la cepa letal de Junín (Weissenbacher et al., 1975/1976, 1982; Damonte et al., 1978).

Intentos para determinar el rearreglo de Gp-1 y GP-2 dentro de GPC para LCM y de identificar el sitio de clivaje proteolítico por secuenciación directa de la proteína, para Buchmeier et al. (1987), fueron infructuosos, ya que a pesar de tener suficiente cantidad de proteína no les fue posible secuenciar GP-2 extraída de geles de PAA-SDS, posiblemente por hallarse la proteína bloqueada. Como alternativa los autores sintetizaron péptidos sintéticos, deducidos de la secuencia genómica, con los cuales prepararon sueros en conejos. Así definieron el aa 262 a 263 en la secuencia aminoacídica de LCM-GPC como el sitio probable de clivaje, correspondiente a Arg-Arg.

Nosotros definimos el sitio de clivaje de GPC en el VJ entre los aa lisina 247 y alanina 248 y establecimos que el glutamato 54 es el aa terminal de GP-1, coincidiendo con Tacaribe pero no con Junín y, la alanina 247 para GP-2.

A pesar de que los virus envueltos pertenecen a varias familias taxonómicas diferentes, el precursor glicoproteico de muchos de ellos posee un sitio de clivaje oligobásico y son clivadas en cultivos celulares susceptibles en ausencia de proteasas suplementarias. La furina es una endoproteasa localizada en la membrana de Golgi, en una variedad de tejidos y líneas celulares y se postula que posiblemente esté involucrada en el procesamiento de las proproteínas en el camino secretorio constitutivo; y así, parecería ser la responsable del clivaje en sitios oligobásicos o en el sitio consenso RXK/RR, que es el motivo mínimo para reconocimiento.

Sabiendo que la banda de 38kDa corresponde a dos glicoproteínas y reanalizando nuestros estudios relacionados con la importancia del hidrato de carbono concluimos que las partículas del virus Junín tratadas con TM no son infecciosas y que la glicosilación de las proteínas de envoltura no son requeridas para la maduración del virus y su liberación. Según datos publicados por Daelli & Coto (1982), cuando células Vero se infectan con virus Junín en presencia de tunicamicina la

maduración del virus ocurre normalmente aún con GP-1 y GP-2 sin glicosilar pero afectando en cambio la infectividad de la partícula madura, coincidiendo con nuestros resultados. Ni en este trabajo, ni en el nuestro, se examinó el procesamiento del precursor GPC del virus, pero para LCM se comprobó que el clivaje de GPC es dependiente de la glicosilación (Wright et al 1989) y que esta función es necesaria para la maduración del virus (Wright et al 1990). La discrepancia entre ambos grupos puede ser debida a los tiempos a los cuales la droga se agregó a las células.

Si analizamos los resultados de los experimentos de crecimiento del virus en presencia del inhibidor de glicosilación, pero relacionándolos con la secuenciación de las glicoproteínas, que fue realizada en esas mismas condiciones, podemos concluir que:

- Ambas, GP-1 y GP-2, tienen uniones N-glicosídicas.
- El clivaje de GPC para dar las dos proteínas estructurales se produce aún en ausencia de azúcares a diferencia de lo informado por Wright et al. (1990) para el virus de LCM.
- Ni GP-1 , ni GP-2 sin azúcares son digeridas por proteasas.
- La brotación del virus tiene lugar porque las nucleocápsides son capaces de reconocer la membrana celular alterada con GP-1 y GP-2 sin glicosilar.

- Los azúcares parecen ser esenciales para la adsorción del virus a los receptores de la membrana plasmática celular.
- El entorno aminoacídico al sitio de clivaje del precursor glicoproteico sería QLPRRSLK↓AFF. Una cadena de carbohidratos, en la vecindad del sitio de clivaje oligobásico del virus de influenza virulento, modula el clivaje, posiblemente por enmascaramiento del sitio de clivaje.

Se ha encontrado que el tratamiento de los virus Pichinde y LCM con pronasa o bromelina (Veza et al, 1977; Gard et al, 1977; Buchmeier et al, 1978) o de Tacaribe o de Tamiani con quimiotripsina específicamente remueve la marca de glucosamina de los glicopéptidos indicando que al menos una parte de ellos están expuestos en la superficie de la envoltura viral.

Dado que la remoción de los glicopéptidos por proteasas coincide con la desaparición de las espículas en la envoltura viral, las glicoproteínas probablemente residan en estas espículas (Veza et al., 1977). El ensamblado de los viriones para arenavirus parecería ocurrir por la interacción directa entre la nucleocápside y una cola citoplasmática en las glicoproteínas, las cuales estarían expuestas sobre la superficie interna de la membrana plasmática. En nuestro trabajo el tratamiento de viriones con proteasas dejó un polipéptido de 11 kDa incorporado a las partículas luego de purificadas, que si bien no

lo hemos secuenciado, probablemente corresponda a la porción glicoproteica que no sobresale de la envoltura.

Las predicciones por computadora de estructura secundaria mostraron que los 233 aa de GP-2 de LAS forman un complejo homotetramérico conteniendo un ectodominio de 164aa y un endodominio de 69, además de 20 o 25 aa hidrofóbicos que atraviesan la membrana (Chambers et al, 1990). Si tomamos como promedio de PM 160 para un aa, el polipéptido de 11kDa que obtuvimos por tratamiento del virión con enzimas, correspondería a unos 60 a 70 aa, concordando con los datos estimados para el endodominio de LAS.

Una secuencia de aa hidrofóbica, entre los residuos 441-459 en la secuencia de NP podría servir como región de enlace a la membrana (Zeller et al, 1988). La función de esta asociación así como la topología de transmembrana todavía no se han determinado.

En los Arenavirus se ha demostrado la asociación de otras proteínas virales además del polipéptido Np a las nucleocápsides. Por ejemplo Ramos et al. (1972) habían informado que la glicoproteína G₁ del virus Pichinde permanece unida a las nucleocápsides preparadas por solubilización en condiciones de baja concentración salina (100 mM NaCl).

Este tipo de asociación dependiente de la fuerza iónica

se analizó posteriormente en estudios topológicos de la glicoproteína asociada a membrana SFV (Ziemiecki et al., 1980), donde se demostró la asociación entre el extremo carboxilo terminal expuesto en la cara externa de la membrana plasmática con la nucleocápside.

Esta unión debido a interacciones electrostáticas según Young & Howard (1983), también se daría en Pichinde entre la nucleoproteína viral y el dominio de transmembrana de la glicoproteína G_1 , lo cual para el autor sería un factor importante en la iniciación del ensamblado viral y en el control limitado del empaquetado de la nucleoproteína.

En el caso de un virus envuelto como el virus de la estomatitis vesicular, el estudio de "crosslinking" intermolecular producido por diversos agentes ha permitido comprender una faceta intrigante de su maduración, es decir, el proceso por el cual la proteína de matriz (M) reconoce aquellas áreas de la célula infectada que han sido modificadas por la inserción de la glicoproteína viral (G). Este reconocimiento podría resultar de una interacción directa de la proteína M con la porción de la proteína G que sobresale de la cara interna de la membrana plasmática. La existencia de ciertos tipos de contactos entre las proteínas G y M fue demostrada por Dubovi &

Wagner (1977), quienes realizaron un detallado análisis de las proteínas de dicho virus.

Para LCM también se sugirió la posibilidad que GP-2 y NP estuvieran asociadas dentro del virión y que esta asociación tuviera un rol importante en la brotación del virus.

Para el caso del VJ nuestros experimentos de "crosslinking" con colorantes heterocíclicos nos permiten suponer algún tipo de asociación entre NP y GP-1 o GP-2, ya que las dos bandas 64 y 38 kDa fueron recuperadas por disociación del complejo. Nuevamente el hecho de comigrar las dos glicoproteínas nos impide determinar cual es la más cercana a NP, pero por comparación con otros miembros de la familia suponemos que se trataría de GP-2.

Una de las técnicas más útiles para separar polipéptidos en mezclas complejas es la electroforesis en SDS. Sin embargo el SDS es un desnaturizante proteico muy efectivo, generalmente torciendo toda la estructura terciaria y cuaternaria para formar complejos proteína-dodecilsulfato con forma de varilla. Las proteínas así desnaturizadas se recuperan con diversos rendimientos por procedimientos que separen a la proteína del dodecil sulfato bajo condiciones en las que la cadena polipeptídica pueda replegarse, volver a tener su actividad biológica y posiblemente su estructura terciaria original.

Estos métodos incluyen una cromatografía de intercambio aniónica en urea, dilución en clorhidrato de guanidina y otros más específicos. En nuestro caso, el elegido fue el Tritón X-100 por ser un detergente que por si sólo no desnaturaliza las proteínas solubles y por tener la función de desplazar la proteína unida al dodecil-sulfato. El mecanismo de recuperación de proteína biológicamente activa se basó en la remoción del SDS unido a la proteína realizado por el Tritón X-100 y la consecuente formación de micelas mixtas de SDS-Tritón. Sin Tritón ni SDS la proteína puede replegarse a su conformación nativa.

Es necesario tener en cuenta el camino de la biosíntesis de una proteína para predecir la recuperación de la actividad biológica por replegamiento.

Muchas proteínas son sintetizadas en los ribosomas citoplasmáticos como grandes precursores polipeptídicos. Si estas proteínas completan su plegamiento antes que las secuencias adicionales sean proteolíticamente procesadas se podría suponer que el polipéptido maduro desnaturalizado no pueda replegar espontáneamente a su estructura nativa sin tener estos residuos. Esta actuación está bien documentada para insulina donde poca o ninguna renaturalización ocurre sin la presencia del péptido "C", el cual es procesado afuera de la hormona ma-

dura. Y por el contrario, se sabe que no se requieren secuencias adicionales en el extremo N-terminal de la proinsulina para su renaturalización.

La separación de la glicoproteína de envoltura de la nucleocápside viral por solubilización de la membrana viral a una alta relación detergente-membrana con detergentes no iónicos ha sido obtenida para muchos virus, tanto de la familia de los Arena, como Toga, Paramixo y Oncorna. Estos surfactantes se unen al dominio hidrofóbico de las proteínas de membrana formando complejos solubles, los cuales pueden ser separados fácilmente de la nucleocápside hidrofílica por sedimentación en gradientes de densidades. En la mayor parte de los casos estudiados, el complejo proteína-detergente contiene no más de una especie de proteínas.

En este trabajo de tesis, todos los métodos empleados para aislamiento de las glicoproteínas nos condujeron a la visualización de una sóla, con el método de identificación utilizado (gel de PAA-SDS), excepto en el análisis aminoacídico, donde comprobamos que se trataba de dos; sin embargo, de haber realizado los experimentos en orden inverso probablemente hubiéramos intentado extremar las condiciones para separar las dos glicoproteínas. La experiencia obtenida en el aislamiento y en la preparación de inmunosueros será volcada en próximos

trabajos tendientes a asignar características funcionales a cada una de ellas GP-1 y GP-2.

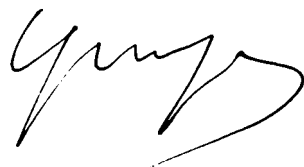
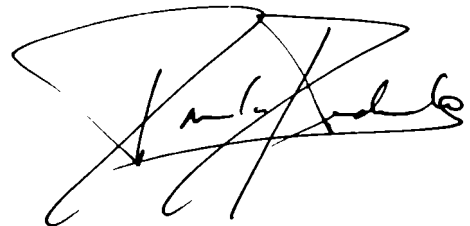
Cabe preguntarnos entonces cuando afirmamos que GP-38 es la responsable de la producción de anticuerpos neutralizantes ¿estaremos refiriéndonos a la acción conjunta de GP-1 y GP-2?.

El uso creciente de los anticuerpos monoclonales en esta etapa debería ayudarnos a contestar ésta y otras preguntas.

Cuando un panel de anticuerpos monoclonales se usó para analizar la reactividad de distintas cepas de laboratorio de LCM, LAS y MOP (Buchmeier, 1984) se vió que aquellos anticuerpos dirigidos contra la GP-2 cruzaban por inmunofluorescencia con todos los sustratos examinados, mientras que los monoclonales dirigidos contra GP-1 o bien resultaron específicos de la cepa o reaccionaron con un subgrupo de las cepas examinadas. Posteriormente se mostró la existencia de por lo menos cuatro sitios antigénicos en GP-2 de LCM (Parekh & Buchmeier, 1986). Uno de ellos fue específico de cepa, otros dos indujeron reacción cruzada y el último mostró actividad neutralizante. La observación de que algunos anticuerpos de GP-2 produzcan reacción cruzada sugiere la conservación de epitopes en la superficie de la envoltura entre los arenavirus del "viejo" y del "nuevo mundo". Este resultado fue confirmado usando péptidos sintéticos (Weber & Buchmeier, 1988). Una

comparación similar se realizó para los virus africanos Lassa, Mopeia y Mobala, usando anticuerpos monoclonales (Gonzalez et al. 1983; 1984). Nuevamente diversos grados de reactividad cruzada se pudieron observar entre las cepas, usando reactivos específicos para GP-2.

A pesar del avance de los estudios realizados hasta el momento en las proteínas de los Arenavirus, otros aportes serán necesarios para entender la complejidad antigénica de este grupo de virus, sobre todo para las glicoproteínas de envoltura que es donde probablemente se halle la mayor diversidad genómica.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Gonzalez'.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Gonzalez'.

BIBLIOGRAFIA

VI BIBLIOGRAFIA

Alexander, S. & Elder, J.H. (1984). Carbohydrate dramatically influences immune reactivity of antisera to viral glycoprotein antigens. *Science* 226:1328-1330.

Auperin, D.D. & Mc Cormick, J.B. (1989). Nucleotide sequence of the Lassa virus (Josiah strain) S genome RNA and amino acid sequence comparison of the N and GPC proteins to other arenaviruses. *Virology* 168:421-425.

Auperin, D.D., Romanowski, V., Galinski, M. & Bishop, D.H.L. (1984). Sequencing studies of Pichinde arenavirus S RNA indicate a novel coding strategy, an ambisense viral S RNA. *J. Virol.* 52:897-904.

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.

Ben Porat, T & Kaplan, A.S. (1971). Phospholipid metabolism of Herpesvirus infected and uninfected rabbit kidney cells. *Virology* 45 252-264

Berría, M.I., Gutman Frugone, L.F., Girda, R. & Barrera Oro, J.G. (1967). Estudios inmunológicos con virus Junín. I. Formación de anticuerpos en cobayos inoculados con virus vivo. *Medicina (Bs.As.)* 27:93-96

- Bishop, D.H.L. & Auperin, D.D. (1987) Arenavirus gene structure and organization. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 133:5
- Boersma, D.P., Saleh, F., Nakamura, K. & Compans, R.W. (1982). Structure and glycosylation of Tacaribe viral glycoproteins. *Virology* 123:452-456.
- Bonatti, S. & Blobel, G. (1979). Absence of cleavable signal sequence in Sindbis virus glycoprotein PE2. *J. Biol. Chem.* 254:12261-12264
- 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.
- Bruns, M., Cihak, J., Muller, G. & Lehmann-Grube, F. (1983) Lymphocytic choriomeningitis virus. VI: isolation of a glycoprotein mediating neutralization. *Virology* 130:247-251.
- 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. (1984). Antigenic and structural studies of the glycoproteins of lymphocytic choriomeningitis virus, in: *Segmented Negative Strand Viruses* (D.H.L. Bishop & R.W. Compans, eds.), pp. 193-200, Academic Press, New York.
- Buchmeier, M.J., Elder, J.H. & Oldstone, M.B.A. (1978). Protein structure of lymphocytic choriomeningitis virus: identifica-

tion of the virus structural and cell associated polypeptides. *Virology* 89, 133-145.

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., Southern, P.J., Parekh, B.S., Wooddell, M.K. & Oldstone, M.B.A. (1987). Site-specific antibodies define a cleavage site conserved among arenavirus GPC glycoproteins. *J. Virol.* 61:982-985.

Burns, J.W. & Buchmeier, M.J. (1991) Protein-protein interactions in lymphocytic choriomeningitis virus. *Virol.* 183:620

Burns, J.W. & Buchmeier, M.J. (1993) Glycoproteins of the Arenaviruses. In *The Arenaviridae* pp 17. Ed. M.S. Salvato, Plenum Press.

Butterworth, B.E. (1977). Proteolytic processing of animal virus proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 77:1-42.

Campadelli-Fiume, G., Sinibaldi-Vallebona, P., Cavrini, V. & Mannini-Palenzona, A. (1980). Selective inhibition of herpes simplex virus glycoprotein synthesis by a benz-amidinohydrazone derivative. *Arch. Virol.* 66:179-191.

Candurra, N.A., Scolaro, L.A., Mersich, S.E., Damonte, E.B. & Coto, C.E. (1990). A comparison of Junin virus strains; growth characteristics, cytopathogenicity and viral polypeptides.

Res. Virol. 144:505.

Castilla, V. (1995). Virus Junín: mecanismo de entrada a la célula huésped. Caracterización y función biológica de la glicoproteína principal de envoltura, Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Bs. As., Argentina

Clarke, S. (1981). Direct renaturation of the dodecyl-sulfate complexes of proteins with triton X-100. Biochim. Biophys. Acta 670:195-202.

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, M.N. & 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.

Courtney, R.J. (1976) Herpes simplex virus protein synthesis in the presence of 2-deoxy-D-glucose. Virology 73:286-294.

Cresta, B., Padula, P. & Martínez Segovia, Z.M. (1980) Biological properties of Junín virus proteins. Intervirology 13:284-288.

Chambers, P., Pringle, C.R. & Easton, A.J. (1990). Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. J. Gen. Virol.

71:3075.

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.

Daelli, M. & Coto, C.E. (1982). Inhibición de la producción de partículas infecciosas en células infectadas con virus Junín en presencia de Tunicamicina. *Rta. Arg. de Microb.* 14:171-176.

Damonte, E.B., Coto, C.E., Calello, M.A., Weissenbacher, M.C. (1978). Inmunización heteróloga contra virus Junín. Protección temprana. *Medicina* 38:226-232.

Damonte, E.B., Mersich, S.E., Candurra, N.A. & Coto, C.E. (1985). Junín and Tacaribe viruses: neutralizing and immunoprecipitating cross-reactivity. *Med. Microbiol. Immunol.* 175:85

Damonte, E.B., Mersich, S.E. & Candurra, N.A. (1994). Intracellular processing and transport of Junín virus glycoproteins influences virion infectivity. *Virus Res.* 34:317-326.

Davie, E.W. & Fujikawa, K. (1975). Basic mechanisms in blood coagulation. *Annu. Rev. Biochem.* 44:799-829.

De Mitri, M.I. & Martínez Segovia, Z.M. (1985) Polypeptide synthesis in Junín virus-infected BHK-21 cells. *Acta Virol.* 29:97-103.

Dougherty, W.G. & Semler, B.L. (1993). Expression of virus-encoded proteinases similarities with cellular enzymes. *Micro-*

biol. Rev. 781-822.

Dubovi, E.J. & Wagner, R.R. (1977). Spatial relationships of the proteins of vesicular stomatitis virus: induction of reversible oligomers by cleavable cross-linkers and oxidation. *J. Virol.* 22:500.

Elder, J.H. & Alexander, S. (1982) Endo- β -N-acetylglucosaminidase F: endoglycosidase from *Flavobacterium meningosepticum* which cleaves both "high mannose" and "complex" type glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79:4540-4544.

Elder, J.H., Mc Gee, J.S. & Alexander, S. (1986) Carbohydrate side chains of Rauscher leukemia virus envelope glycoproteins are not required to elicit a neutralizing antibody response. *J. Virol.* 57: 340-342.

Fernández Cobo, M., Pasian, E.L. & Martínez Segovia, Z.M. (1982) Mechanism of photoinactivation of Junin virus sensitized by methylene blue. *Comun. Biol.* 1:199-208.

Florman, H.M. & Wassarman, P.M. (1985). O-linked oligosacarides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* 41:313-324.

Franze-Fernández, M.T., Zetina, C., Iapalucci, S., Lucero, M.A., Bouissou, C., Lopez, R., Rey, O., Daeli, M., Cohen, G.N. & Zakin, M.M. (1987). Molecular structure and early events in replication of Tacaribe arenavirus S RNA. *Virus Res.* 7:309-324.

Furth,A.J. (1980). Removing unbound detergent from hydrophobic proteins. *Anal. Biochem.* 109:207-215

Gard,G.P., Vezza,A.C., Bishop,D.H.L. & Compans,R.W. (1977) Structural proteins of Tacaribe and Tamiami virions. *Virology* 83:84-95.

Garoff,H., Frischauf,A.M., Somons,K., Lehrach,H. & Delius,H. (1980). Nucleotide sequence of cDNA coding for Semliki Forest virus membrane glycoprotein. *Nature (London)* 288:236-241.

Ghiringhelli,P.D., Rivera-Pomar,R.V., Baro,N.I., Rosas,M.F., Grau,O. & Romanowski,V. (1989). Nucleocapsid protein gene of Junín arenavirus (cDNA) sequence. *Nucleic Acids Res.* 17:8001

Ghiringhelli,P.D., Rivera-Pomar,R.V., Lozano,M., Grau,O. & Romanowski,V. (1991). Molecular organization of Junín virus S RNA: Complete nucleotide sequence, relationship with the other members of Arenaviridae and unusual secondary structures. *J. Gen. Virol.* 72:2129-2141.

Gimenez,H.B., Boersma,D.P.& Compans,R.W. (1983). Analysis of polypeptides in Tacaribe virus-infected cells. *Virology* 128:469-473.

Glabe,C.G., Grabel,L.B., Vacquire,V.D. & Rosen,S.D. (1982). Carbohydrate specificity of sea urchin sperm binding a cell surface lectin mediating sperm-egg adhesion. *J. Cell Biol.* 94:123-128.

Grau, O., Franze-Fernández, M.T., Romanowski, V., Rustici, S.M. & Rosas, M.F. (1981). Junín virus structure, in: *The Replication of Negative Strand Viruses*, pp 11-14. (Bishop D.H.L. & Compans, R.W. eds). Elsevier North Holland, Inc.

Griffiths, C.M., Wilson, M.N. & Clegg, J.C.S. (1992) Sequence of the nucleocapsid protein gene of Machupo virus: close relationship with other South American pathogenic arenavirus, Junín. *Arch Virol* 124:371-377.

Hager, D.A. & Burgess, R.R. (1980) Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzymatic activity: results with sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes. *Anal. Biochem.* 109:76-86.

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

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.

Helenius, A. & Soderlund, H. (1973). Stepwise dissociation of the Semliki Forest virus membrane with Triton X-100. *Biochim. Biophys. Acta* 307:287-300.

Helenius, A. & von-Bonsdorff, C.H. (1976). Semliki Forest virus membrane proteins preparation and characterization of spike

complexes soluble in detergent-free medium. *Biochim. Biophys. Acta* 436:895-899.

Hemming, F.W. (1977). Dolichol phosphate, a coenzyme in the glycosilation of animal membrane-bound glycoproteins. *Biochem Soc. Trans.* 5:1223-1331.

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

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

Holzer, H., Heinrich, P.C. (1980). Control of proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 63-91

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

Howard, C.R. (1986). Arenavirus replication. Perspectives in medical virology. Zuckerman, A.J. (de) The Netherlands.

Howard, C.R., Lewicki, H.A., Allison, L., Salter, M., Buchmeier, M.J. (1985). Properties and characterization of monoclonal antibodies to Tacaribe virus. *J. Gen. Virol.* 66:1383-1395.

Iapalucci, S., Cherňavsky, A., Rossi, C.M., Burgin, M.J. & Franze-Fernández, M.T. (1994). Tacaribe virus gene expression in cytopathic and non-cytopathic infections. *Virology* 200:613-622

Iapalucci, S., Lopez, 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., Lopez, R., Rey, O., Lopez, N. & Franze-Fernández, M.T. (1989a). Tacaribe virus L gene encodes a protein of 2210 amino acid residues. *Virology* 170:40.

Joklik, W.K., Willett, H.P., Amos, D.B. & Wilfert, C.M. (eds). (1994) *Zinsser Microbiología*. Editorial Médica Panamericana.

Kaplan, A.S. ed. (1973) *The Herpes Virus*, Academic Press, New York.

Kornfeld, R & Kornfeld, S (1980). Structure of glycoproteins and their oligosaccharide units. In: Lennarz, W.J. ed. *The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans*. Plenum, New York, pp 1-34

Klemenz, R. & Diggelmann, H. (1979). Extracellular cleavage of the glycoprotein precursor of Rous sarcoma virus. *J. Virol.* 29:285-292.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227:680-685.

Lascano, E.F & Berria, M.I. (1974). Ultrastructure of Junin virus in mouse whole brain and mouse brain tissue culture. *J. Virol.* 14:965.

Lazarowitz, S.G. & Choppin, P.W. (1975) Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology* 48:440-454.

Lee, S.H., Cohen, N.S., Jacobs, A.J. & Brodie, A.F. (1979). Isolation purification and reconstitution of a proline carrier protein from mycobacterium phlei. *Biochemistry* 18:2232-2238.

Leung, W.C., Gosh, H.P. & Rawls, W.E. (1977). Strandedness of Pichinde virus RNA. *J. Virol.* 22:235.

Markwell, M.A.K. & Fox, C.F. (1980) Protein-protein interactions within Paramixoviruses identified by native disulfide bonding or reversible chemical crosslinking. *J. Virol.* 33: 152-166.

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

Martínez Segovia, Z.M., Argüelles, G. & Tockman, A. (1980) Capacidad antigénica del virus Junín inactivado mediante oxidación fotodinámica. *Medicina* 40: 156-160.

Matsudaira, P.T. (ed) (1989). A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing. Academic Press. USA.

Mersich, S.E., Castilla, V. & Damonte, E.B. (1988). Lectin affinity of Junín virus glycoproteins. *Ann. Inst. Pasteur/Virol.* 139:277.

Montelaro, R.C. & Bolognesi, D.P. (1980) Retroviruses. In: Cell Membranes and Viral Envelopes. Vol.2, pp. 683-707. H.A. Blough

& J.M.Tiffany (Eds.), Academic Press, London.

Murphy, F.A. & Whitfield, S.G. (1975) Morphology and morphogenesis of arenaviruses. Bull. WHO 52:409-419.

Myers, E.W. & Miller, W. (1988) Optimal alignments in linear space. CABIOS 4:11-17.

Nagata, Y., Burger, M.M. (1974) Wheat germ agglutinin: molecular characteristics and specificity for sugar binding. J. Biol. Chem. 249:3116-3122.

Nayak, D.P. & Jabbar, M.A. (1989) Structural domains and organizational conformation involved in the sorting and transport of influenza virus transmembrane proteins. Ann. Rev. Microbiol. 43:465.

Needleman, S.B. & Wunsch, C.D. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. J. Mol. Biol. 48:443-453.

Neurath, H. & Walsh, K.A. (1976) Role of proteolytic enzymes in biological regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:3825-3832

Oakley, B.R., Kirsch, D.R. & Morris, N.R. (1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 105:361-363.

Olden, K., Parent, J.B. & White, S.L. (1982). Carbohydrate moieties of glycoproteins. A re-evaluation of their function

Biochim. Biophys. Acta 650: 209-232

Palese, P. & Schulman, J.L. (1976). Mapping of the influenza virus genome: Identification of the hemagglutinin and neuraminidase genes. Proc. Nat. Acad. Sci. 73:2142-2146

Parekh, B.S. & Buchmeier, M.J. (1986). Proteins of lymphocytic choriomeningitis virus: Antigenic topography of the viral glycoproteins. Virology 153:168-178.

Parodi, A.J., Leloir, L.F. (1979). The role of lipid intermediate in the glycosilation of proteins in the eucaryotic cell. Biochim. Biophys. Acta 559:1-37.

Parodi, A.S., Greenway, D.J., Ruggiero, H.R., Rivero, S., Frigerio, M., Barrera, J.M., Mettler, N., Garzon, F., Boxaca, M., de Guerrero, L. & Nota, N. (1958). Sobre la etiología del brote epidémico de Junín. Día Médico 30:2300-2302.

Pizer, L.I., Cohen, G.H. & Eisenberg, R.J. (1980). Effect of tunicamycin on herpes simplex virus glycoproteins and infectious virus productions. J. Virol. 34:142-153.

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

Reich, E., Rifkin, D.B. & Shaw, E. (eds) (1975). Protease and biological control. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Rice, C.M. & Strauss, H. (1981). Nucleotide sequence of the 26S mRNA of Sindbis virus and deduced sequence of the encoded vi-

rus structural proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2062-2066.

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

Robbins, P.W., Hubbard, S.C., Turco, S.J. & Wirth, D.F. (1977). Proposal for a common oligosaccharide intermediate in the synthesis of membrane glycoproteins. Cell 12:893-900.

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 Res. 2:35-51.

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

Romanowski, V. (1993). Genetic organization of Junin virus, the etiological agent of argentine hemorrhagic fever. The Arenaviridae pp:51-83, Salvato, M.S. (ed) Plenum Press, New York.

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 Res. 3:101-114.

- Rossi, C.M. (1994). Expresión y caracterización de las proteínas del virus Tacaribe, tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Bs. As., Argentina.
- 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. (1970). 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., Fisher-Hoch, S.P. & McCormick, J.B. (1991). Antigenic relatedness between arenaviruses defined at the epitope level by monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 72:549-555.
- Sabatini, D.D., Kreibich, G., Morimoto, T. & Adesnik, M. (1982). Mechanisms for the incorporation of proteins in membranes and organelles *J. Cell Biol.* 92: 1-22
- Saleh, F., Gard, G.P. & Compans, R.W. (1979). Synthesis of Tacaribe viral proteins. *Virology* 93:369-376.
- Salvato, M., Shimomaye, E., Southern, P. & Oldstone, M.B.A. (1988). Virus-lymphocyte interactions. IV Molecular characterization of LCMV Armstrong (CTL+) small genomic segment and that of its variant, clone 13. *Virology* 164:517-522.
- Salvato, M.S. & 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.

- Sarov, I. & Joklik, W.K. (1972). Studies on the nature and location of the capsid polypeptides of Vaccinia virions. *Virology* 50:143-156
- Scolaro, L.A., Mersich, S.E. & Damonte, E.B. (1990). A mouse attenuated mutants of Junin virus with an altered glycoprotein. *Arch. Virol.* 11:257-262.
- Schechter, I. & Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases I: Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27:157-162
- Schmidt, M.F.G. (1983). Fatty acid binding: a new kind of post-translational modification of membrane proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 102:101-129
- Schulze, I.T. (1970). The structure of Influenza virus. 1- The polypeptides of the virion. *Virology* 42:890-904
- Shapiro, S.Z. & August, J.A. (1976) Proteolytic cleavage events in oncornavirus protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 458: 375-396
- Sharon, N. & Lis, H. (1982). Glycoproteins. In. H. Neurath & R.L. Hill (ed.), *The protein* vol.5 3rd. ed. pp 1-144. Academic Press, Inc., New York.
- Shivaprakash, M., Harnish, D.G. & Rawls, W.E. (1988) Characterization of temperature sensitive mutants of Pichinde virus. *J. Virol.* 62:4037

Singh, M.K., Fuller-Pace, F.V., Buchmeier, M.J. & Southern, P.J. (1987). Analysis of the genomic L RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 161:448-456.

Skehel, J.J & Waterfield, M.D. (1975). Studies on the primary structures of the Influenza Virus haemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 93-97.

Southern, P.J., Singh, M.K., Riviere, Y., Jacoby, D.R., Buchmeier, M.J. & Oldstone, M.B.A., (1987). Molecular characterization of the genomic S RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 157:145-155.

Spear, P.G. & Roizman, B. (1972) Proteins specified by Herpes Simplex virus. V-Purification and structural proteins of the Herpes virion. *J. Virol.* 9 143-159

Steele, J.C.H. & Reynolds, J.A. (1979). Characterization of the apolipoprotein B polipeptide of human plasma low density lipoprotein in detergent and denaturant solutions. *J. Biol. Chem.* 254:1633-1638.

Stephens, E.B. & Compans, R.W. (1988) Assembly of animal viruses at cellular membranes. *Annu. Rev. Microbiol.* 42:489.

Stoker, M.G.P. & Mc Pherson, I.A. (1961). Studies of infection of hamster cell by polyoma virus *in vitro*. *Virology* 14:631-641.

Struck, D.K. & Lennarz, W.J. (1977). Evidence for the participation of saccharide-lipids in the synthesis of the oligosaccha-

ride chain of ovalbumin. J. Biol. Chem. 252 1007-1013.

Struck,D.K. & Lennarz,W.J. (1977). Evidence for the participation of saccharide-lipids in the synthesis of the oligosaccharide side chain of ovalbumin. J. Biol. Chem. 253:1007-1013.

Sturman,L.S., Holmes,K.V. & Behnke,J. (1980) Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. J. Virol. 33 : 449-462.

Takatsuki,A., Arima,K. & Tamura,G. (1971). Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin J. Antibiot 24 224-231.

Takatsuki,A., Khono,K. & Tamura,G. (1975). Inhibition of biosynthesis of polyisoprenol sugars in chick embryo microsomes by tunicamycin. Agr. Biol. Chem. 39 2089-2091.

Tartakoff,A.M. & Vassalli,P. (1978). Comparative studies of intracellular transport of secretory proteins. J. Cell. Biol. 79:694-707.

Tkatz,J.S. & Lampen,J.O. (1975). Tunicamycin inhibition of polyisoprenyl N-acetylglucosaminyl pyrophosphate formation in calf liver microsomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 65 248-257.

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.

Vilches, A.M., Barrera Oro, J.G. & Gutman Frugone, L.F. (1965). Una nueva área epidémica de la fiebre hemorrágica argentina iniciada a continuación de una epizootia en población aumentada de roedores silvestres. Segundas Jornadas Entomoepidemiológicas Argentinas. 3:359-360

von Bonsdorff, C-H. & Patterson, R. (1975) Surface structure of Uukienemi virus. J. Virol. 16:1296.

Ward, C.W. (1981). Structure of influenza virus hemagglutinin. Curr Top Microbiol. Immunol. 94:1-71.

Weber, E.L. & Buchmeier, M.J. (1988) Fine mapping of a peptide sequence containing an antigenic site conserved among arenaviruses. Virology 164:30-38.

Weber, K. & Kuter, D.J. (1971). Reversible denaturation of enzymes by sodium dodecyl sulphate. J. Biol. Chem. 54:504-509.

Weissenbacher, M.C., Coto, C.E. & Calello, M.A. (1975/1976). Cross-protection between Tacaribe complex viruses. Protection of neutralizing antibodies against Junin virus (Argentine hemorrhagic fever) in guinea pigs infected with Tacaribe virus. Intervirology 6:42

Weissenbacher, M.C., Coto, C.E., Calello, M.A., Rondinone, S.N., Damonte, E.B. & Frigerio, M.J. (1982). Cross-protection in non-human primates against Argentine haemorrhagic fever. Infection

and Immunity 35:425.

Whitacker, J.R. & Granum, P.E. (1980). An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. *Anal. Biochem.* 109:156-159

Whitton, J.L., Gebhard, J.R., Lewicki, H., Tishon, A. & Oldstone, M.B.A. (1988a). Molecular definition of a major cytotoxic T-lymphocyte (CTL) epitope in a 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.

Wilson, M.N. & 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.

Williams, K.R. (1989) in "A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing", pp 31-47. Matsudaira, P.T., ed., Academic Press, Inc., San Diego, California.

Wold, F. (1981). In vivo chemical modification of proteins posttranslational modification. *Annu. Rev. Biochem.* 50:783-814.

Wright, K.E., Salvato, M.S. & Buchmeier, M.J. (1989). Neutralizing epitopes of lymphocytic choriomeningitis virus are confor-

mational and require both glycosylation and disulfide bonds for expression. *Virology* 171:417-426.

Wright, K.E., Spiro, R.C., Burns, J.W. & Buchmeier, M.J. (1990). Post-translational processing of the glycoproteins of lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 177:175-183.

Yasumura, Y. & Kawatoka, Y. (1963). Studies of SV40 virus in tissue culture cells. *Nippon Rinsho* 21:1201-1215.

Young, P.R. & Howard, C.R. (1983). Fine structure analysis of Pichinde virus nucleocapsids. *J. Gen. Virol.* 64: 833-842.

Zeller, W., Bruns, M., & Lehmann-Grube, F. (1988). Lymphocytic choriomeningitis virus. X. Demonstration of nucleoprotein on the surface of infected cells. *Virol.* 162:90

Ziemiecki, A., Garoff, W. & Simons, K. (1980). Formation of the Semliki Forest virus membrane glycoprotein complexes in the infected cell. *J. Gen. Virol.* 50:111-123.