

Cambios en virus vaccinia durante la síntesis de RNA in vitro*

Julio Enrique Ospina**

William Munyon***

James T. Grace Jr.****

INTRODUCCION

Kates y McAusland (4) y Munyon, Paolletti y Grace (7), describieron la síntesis in vitro de RNA por partículas

virales purificadas del grupo Pox. Esta síntesis requiere la presencia de los cuatro nucleósidos trifosfatos comunes, mercaptoetanol y $MgCl_2$. Este Descubrimiento implica que partículas virales Pox maduras e infecciosas, contienen una enzima, RNA polimerasa, la cual bajo condiciones apropiadas tiene la habilidad de inducir la síntesis de RNA in vitro. Un aspecto importante de esta síntesis es su total dependencia de grupos sulfhidrilo.

* *Este trabajo se llevó a cabo con ayuda económica de la "United Health Foundation of Western New York" y de la Fundación John A. Hartford, en el Departamento de Oncología Viral del Roswell Park Memorial Institute de Buffalo, New York.*

** *Jefe Grupo de Microscopía Electrónica de la Sección de Investigación, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá. Profesor Asistente de Patología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.*

*** *Senior Research Cancer Scientist, Viral Oncology Department, Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, New York.*

**** *Head Viral Oncology Department and Director Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, New York.*

En este trabajo se describen los cambios morfológicos ultraestructurales del virus vaccinia durante la polimerización del RNA. Estos cambios son mayormente debidos a la presencia de grupos sulfhidrilo.

MATERIAL Y METODOS

Células: Fibroblastos, cepa L. cultivados en suspensión.

Virus: Vaccinia, cepa IHD, obtenidos de Saul Kit y Del Dubbs.

Medio: Eagle (2), suplementado con suero de ternero al 10%.

CRECIMIENTO DE VIRUS Y PURIFICACION:

Células en rápido crecimiento fueron colocadas en solución salina de Pucks A. suplementada con 20mM de $MgCl_2$ en una concentración de 1×10^7 células por ml. e infectadas con vaccinia en una multiplicidad de 10 unidades formadoras de placas (PFU) por célula. Después de un período de absorción de 30 min. a $37^\circ C$, las células fueron sedimentadas a 225 g por 5 min. y resuspendidas en una concentración de 8×10^5 células por ml. en medio de Eagle. Veinticuatro horas después de la infección, las células fueron sedimentadas a 500 g por 10 min. y el sobrenadante con 0.5% de Tween 80 (v/v), en una concentración de 5×10^7 células por ml. y agitadas vigorosamente para romper las membranas citoplasmáticas. La ruptura celular se confirmó por medio de microscopía de contraste de fases. La suspensión fue entonces centrifugada a 4.600 g por 20 min. y los sedimentos descartados. Se disolvió sucrosa en el sobrenadante en una concentración del 20%. La suspensión fue sonicada durante 40 segundos y 7 ml. de ella se colocaron sobre cada uno de una serie de gradientes lineales de sucrosa del 25% al 40%, preparados en tampón fosfato 0.001M pH 8.0 con 0.5% de Twen 80. Los gradientes fueron centrifugados a 31,580 g por 45 min. Las bandas de partículas virales se removieron del gradien-

te y sedimentadas a 105,000 g por 1 hora. Los sedimentos fueron resuspendidos en 10 ml. de 0.001 M de tampón fosfato, sonificados de nuevo por 10 segundos y una vez mas centrifugados en gradientes de sucrosa. Los virus así obtenidos se usaron en los experimentos y su pureza se estableció por medio de la coloración de Morosow (6), microscopía electrónica y cultivos bacterianos en la forma previamente descrita por Munyon y Colaboradores (7). Una unidad de densidad óptica de vaccinia (abreviada) (ODU) contiene 65 ug de proteína.

MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Se colocaron pequeñas gotas de las suspensiones de partículas virales sobre bloques de agar Noble al 4%. Sobre los mismos puntos se dejaron caer gotas de Formvar así formada se hizo flotar en agua filtrada y se colocó en una rejilla de cobre de 300" mesh". Se hizo coloración negativa por medio de fosfotungstato al 1.5%, pH 7.0. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio Hitachi 11A con una aceleración de voltaje de 75 kilovoltios.

REACCION DE RNA POLIMERASA.

Fue hecha de acuerdo con la descripción de Munyon y Colaboradores (7).

TITULACION EN PLACAS.

Se hizo en monocapas de fibroblastos L. cultivados en platos plásticos de Petri. Después de sonicación, prepa-

raciones diluídas de los virus en volúmenes de 0.2 milímetros se colocaron sobre las monocapas las cuales fueron incubadas por 1 hora a 36°C. Al cabo de este tiempo se añadió medio de Eagle suplementado con suero de ternero al 5%. Las células se incubaron por 2 días a 36°C. y finalmente se colorearon con cristal violeta.

DETERMINACION DE PROTEINAS.

Se siguió el método de Folin(5).

RESULTADOS

Los virus vaccinia se incubaron en series de medios diferentes por 2 horas a 36.5°C. y examinados al microscopio electrónico. Las fotografías de los virus tratados en la forma descrita en el texto se muestran en las figuras 1 a 7.

Vaccinia incubada en 0.001M tris (ph 8.0), en TKM (0.1M tris=ph 8.4, 0.0376M KCL, y 0.005M MgCl₂), y en TKM conteniendo 0.0018M ATP, tenía un aspecto morfologico normal (ver figuras 1,2,3,). La incubación de vaccinia en TKM conteniendo 0.007M mercaptoetanol (ver figura 4) produjo un cambio definitivo en la cápsula externa del virus consistente en la formación de pequeñas vesículas parecidas a burbujas sobre la superficie del virus. Vaccinia incubado en TKM, mercaptoetanol y 0.0018M ATP (figura 5) mostró los mismos cambios observados en TKM y mercaptoetanol excepto que aquellos eran mas intensos y las estructuras internas de las partículas

eran menos claras. Los virus incubados en TKM, mercaptoetanol, UTP, CTP y GTP, cada uno al 0.0006M y ATP al 0.0018M (figura 6), condición en la cual ocurre la polimerización de RNA, parecían similares a aquellos incubados en TKM, mercaptoetanol y ATP excepto que en algunos casos las vesículas formadas de la membrana externa del virus, tomaban aspecto tubular. Este último hallazgo sólo fue observado ocasionalmente, pero los otros cambios se vieron en un 90% o mas de las partículas virales sobre la rejilla. Una fotografía en gran aumento de partículas incubadas en TKM, mercaptoetanol, ATP, GTP, UTP, CTP, se observa en la figura 7.

Las alteraciones inducidas por los anteriores experimentos sobre la infectividad del virus se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

Efecto del Mercaptoetanol y Trifosfatos Nucleósidos sobre la infectividad del virus vaccinia purificado.

INCUBACION POR 2 HORAS A 36.5°C	SUPERVIVENCIA DE INFECTIVIDAD % ⁹
0.001 M tris pH 8.0	100 (2.0x10 ⁹ pfu)
TKM (x)	95
TKM+ATP	100
TKM+Mercaptoetanol	29
TKM+Mercaptoetanol+ATP	27
TKM+Mercaptoetanol+ATP+UTP, GTP, CTP.	29

(x) TKM es 0.1 M tris HCL (pH 8.4); 0.0376 M KCL; 0.005 M MgCl₂.

Los nucleósidos trifosfatos se añadieron en la misma concentración usada en la reacción de RNA polimerasa.

Los más altos títulos se observaron en la presencia de TKM y de TKM mas ATP. La incubación del virus en TKM

FIGURA 1 a 6: Constituyentes de la reacción: 0.15 ODU de los virus vaccinia se incubaron a 36.5°C. por 120 minutos en la presencia de los siguientes compuestos:

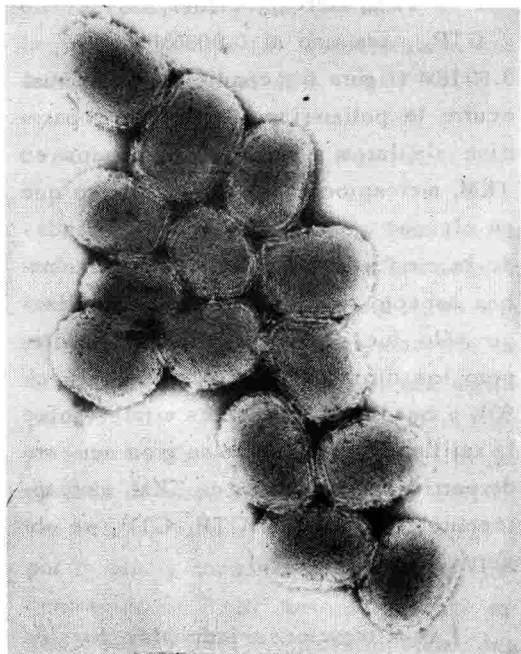


FIGURA 1. 0.001 M tris (pH 8.0).

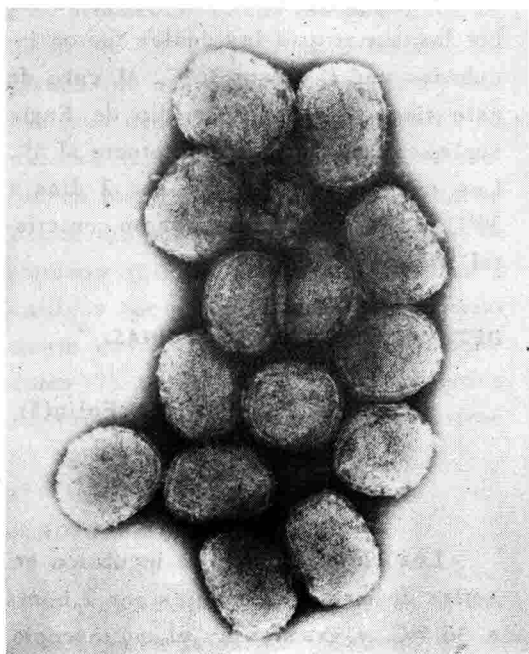


FIGURA 2. TKM (0.1 M tris (pH 8.4), 0.0376 M KCL y 0.005 M $MgCl_2$).

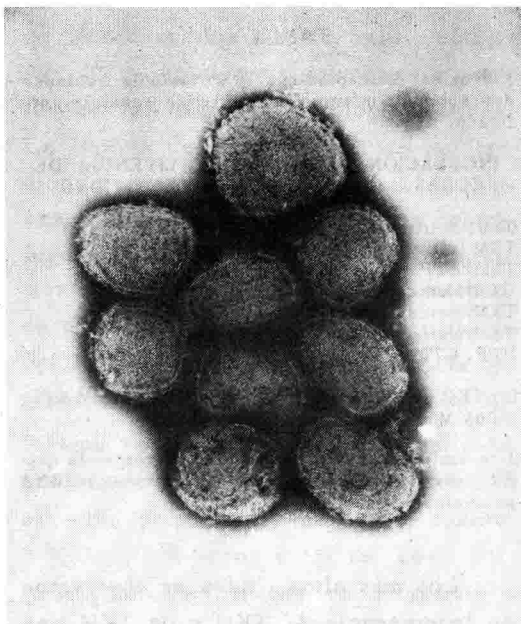


FIGURA 3. TKM y 0.0018 M ATP.

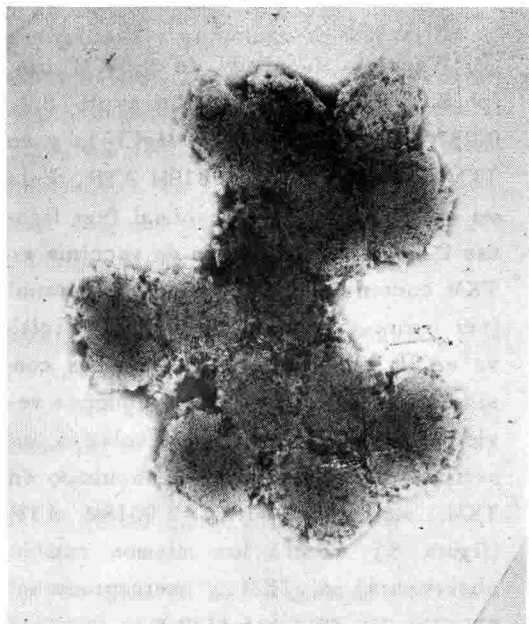


FIGURA 4. TKM y 0.007 M mercaptoetanol.

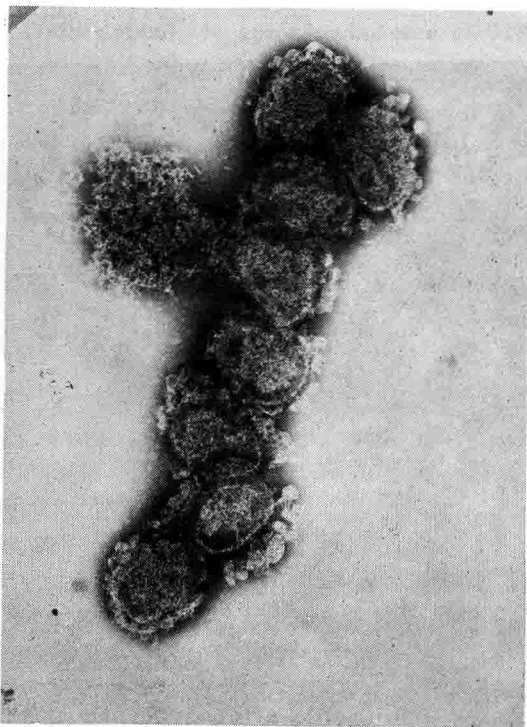


FIGURA 5. TKM, 0.007 M mercaptoetanol y 0.0018 M ATP.

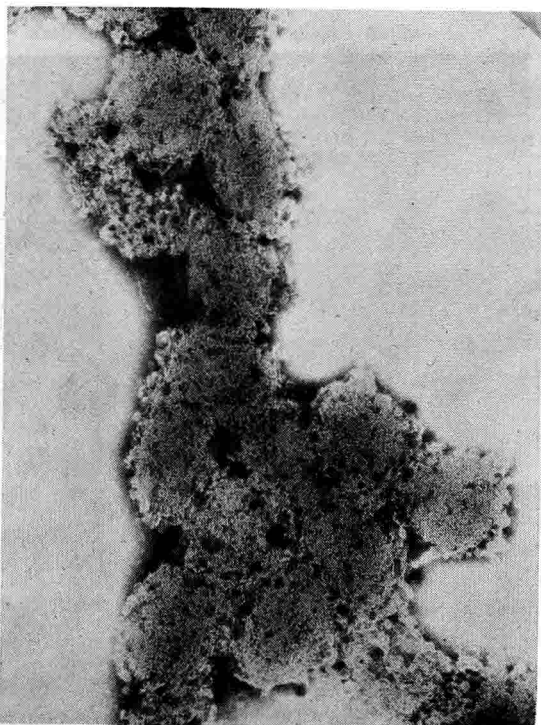


FIGURA 6. TKM, 0.007 M mercaptoetanol, UTP, CTP y GTP cada uno al 0.0006 M y ATP 0.0018 M.

AUMENTOS: 50.000. Figuras 1 a 6.

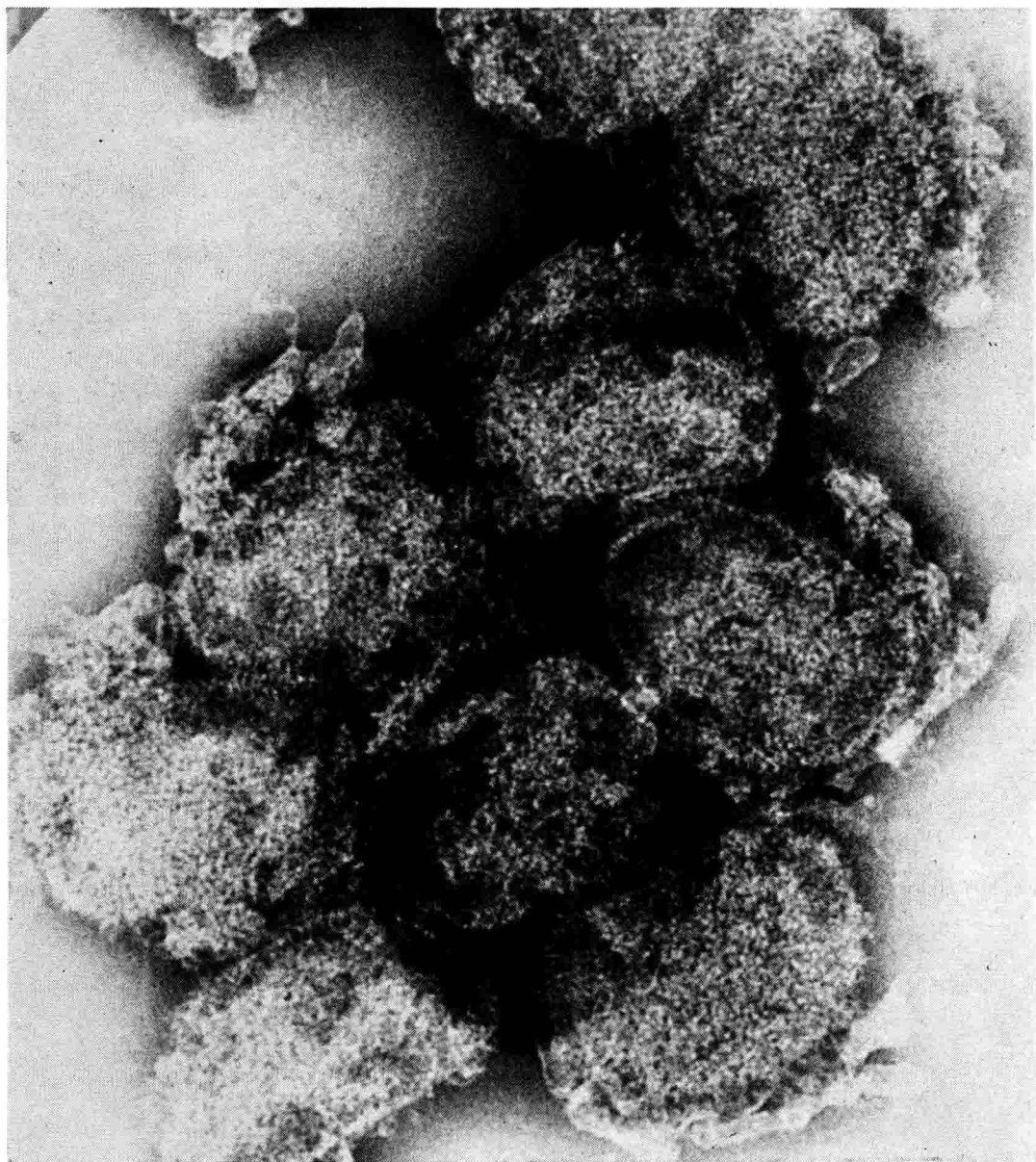


FIGURA 7. Fotografía con 160,000 aumentos de vaccinia incubado a 36.5°C. por 120 minutos en la mezcla de reacción descrita para la Figura 6.

mas 0.007M produjo inactivación de la infectividad, de aproximadamente el 71% con relación al TKM solo. El cambio morfológico inducido por el mercaptoetanol se asocia con pérdida de infectividad del virus.

La Tabla 2 muestra los efectos del ditioneitol sobre la infectividad de vaccinia.

TABLA 2

Efecto del Ditioneitol sobre la infectividad del virus vaccinia.

DITIOTREITOL CONCENTRACION (mM)	SUPERVIVENCIA DE INFECTIVIDAD %
CERO	100 (9.0x10 ⁸ pfu)
0.1	65
0.3	49
1.0	10
3.0	4.7

Virus vaccinia purificado e incubado a 37°C. por 60 minutos en 0.1 M tris pH 8.4.

El ditioneitol inactiva el virus en una forma mas efectiva que el mercaptoetanol. En una concentración al 0.02M ocasiona un cambio morfológico en el virus, similar al inducido por el mercaptoetanol.

Fue informado previamente por nosotros (7) que el mercaptoetanol es esencial para que ocurra la reacción de síntesis de RNA in vitro por vaccinia. Diversos compuestos con grupos sulfhidrilo libres fueron también examinados encontrándose que todos eran efectivos en la síntesis de RNA on vitro como puede concluirse de la Tabla 3.

El orden relativo de eficiencia fue ditioneitol, mercaptoetanol, cisteína y glutatión reducido.

TABLA 3

Efecto de compuestos con grupos Sulfhidrilo sobre la actividad de RNA polimerasa en vaccinia.

COMPUESTO SULFHIDRILLO CTP-H³ (uu MOLES INCORPORADO POR ODU DE VACCINIA EN 40 MINUTOS)

	mM	
Ninguno	0.0	0.0
Mercaptoetanol	2.3	87
Mercaptoetanol	7.0	324
Mercaptoetanol	21.0	1570
Cisteína	2.3	21
Cisteína	7.0	89
Cisteína	21.0	918
Glutación Reducido	2.3	0.0
Glutación Reducido	7.0	22
Glutación Reducido	21.0	509
Ditioneitol	2.3	2750
Ditioneitol	7.0	3740
Ditioneitol	21.0	3250

Virus vaccinia purificado (0.1 ODU) fué incubado por 40 minutos a 36°C. en la presencia de cada uno de los compuestos sulfhidrilo indicados. Otros compuestos en la reacción fueron: TKM (ver Tabla 1), 0.0018 M ATP; UTP y GTP cada uno al 0.006 M; 0.00045 M CTP-H³ (actividad específica 47u c/u mole).

Acido tioglicólico, mercaptoetilamina, 2-3-dimercaptopropanol y acido mercaptosuccínico al 0.007M, sustituyeron también efectivamente al mercaptoetanol. Los virus digeridos con 500 ug/ml. de tripsina cristalina a 30°C. por 1,2,4,8, 16 y 32 minutos no fueron activos en la síntesis de RNA sin la presencia de Mercaptoetanol en la reacción. Igual falta de actividad se observó en virus sometidos a choque termico a 70°C. por períodos de 5 a 90 segundos. En este caso como en el anterior, solamente la adición de mercaptoetanol a la mezcla de reacción permitió la iniciación de la síntesis de RNA.

Cuando se añade vaccinia a la mezcla de reacción de RNA polimerasa a

37°C. ocurre un período de latencia de 8 minutos antes de la polimerización de RNA (7). Munyon, Paoletti, Ospina y Grace (8) demostraron que la fosfohidrolasa de ATP de vaccinia no presenta tal período. La existencia de este período sugiere que la alteración de las partículas virales ocurre antes de la polimerización del RNA.

DISCUSION

Easterbrook (3) reportó que el tratamiento de vaccinia con mercaptoetanol al 1% (0.14M) disolvía la membrana externa del virus y postuló que la cápsula externa de estas partículas virales se mantiene por uniones disulfuro. En nuestros experimentos hemos tratado vaccinia con 0.007M de mercaptoetanol y también hemos observado alteraciones morfológicas similares en la membrana externa del virus. Nuestros datos confirman la hipótesis de Easterbrook, la cual también sugiere que las uniones disulfuro son estructuralmente importantes. Es posible que las vesículas y túbulos formados en la membrana externa del virus sean funcionalmente importantes ya que se presentan durante la síntesis de RNA in vitro. Nagington y Horne (9) observaron estructuras tubulares asociadas con partículas de vaccinia en el citoplasma de células infectadas y creemos que esto soporta nuestra hipótesis.

Mercaptoetanol y ditioneitol inactivan la infectividad de vaccinia, producen cambios morfológicos característicos en la partícula viral y permiten la polimeri-

zación de RNA in vitro por parte de vaccinia. Es dudoso que todos estos efectos sean debidos a alteraciones en las proteínas virales ya que Kates y McAusland describieron la RNA polimerasa de vaccinia como parte integrante de la parte interna del virus. Ellos afirman que la actividad de polimerasa de virus Pox intactos puede demostrarse in vitro si la membrana externa del virus se destruye con mercaptoetanol. Todos los reactivos con grupos sulfhidrilo libres usados en nuestros experimentos sustituyeron al mercaptoetanol en la reacción de RNA polimerasa in vitro. El mas efectivo fué el ditioneitol. Estos resultados sugieren que grupos disulfuro presentes en la cápsula viral deben ser reducidos antes de que ocurra la polimerización de RNA.

Borsa y Graham (1) y Shatkin y Sipe (10) reportaron que reovirus contiene RNA polimerasa que no se activa con compuestos que contengan grupos sulfhidrilo pero sí con choque térmico a 70°C. o por digestión proteolítica. Ni el uno ni la otra pudieron inducir en vaccinia la síntesis de RNA polimerasa in vitro.

La existencia de un período de latencia de 8 minutos en la reacción de RNA polimerasa sugiere que uno o varios cambios deben ocurrir en la partícula viral antes del principio de polimerización. Pensamos que ellos se relacionan con alteraciones en los grupos disulfuro presentes en la cápsula del virus.

Los resultados presentados en este trabajo sobre los efectos de grupos sulf-

hidrilo sugieren que inmediatamente después de la penetración de vaccinia en la célula se rompen los puentes disulfuro de la partícula viral para que en esa forma pueda ocurrir la polimerización de RNA. La presencia de glutatión reducido o cisteína en el citoplasma celular puede ocasionar esta reducción o ella ser llevada a cabo por enzimas presentes en el citoplasma de las células infectadas.

RESUMEN

Observaciones al microscopio electrónico de virus vaccinia previamente incubados en una mezcla para la reacción de RNA polimerasa in vitro, demuestran características alteraciones morfológicas en los virus. Estructuras similares a vesículas y ocasionalmente túbulos se formaron a partir de la membrana externa del virus. Uno de los sustituyentes de la reacción de RNA polimerasa in vitro, mercaptoetanol (0.007M), es el causante

de esta alteración. El cambio morfológico se acompaña de pérdida de la infectividad viral.

La presencia de grupos sulfhidrilo en la mezcla de la reacción enzimática es esencial para la ocurrencia de la síntesis de RNA de vaccinia in vitro. Esta condición no se pudo sustituir por choque térmico a 70°C. ni por digestión parcial del virus por tripsina. Una gran variedad de compuestos con grupos sulfhidrilo pueden reemplazar el mercaptoetanol con efectividad variable. El más activo de ellos fué el ditioneitol.

Un período de latencia de 8 minutos ocurre entre la adición de vaccinia a la mezcla completa para la reacción de RNA polimerasa y la detección de síntesis de RNA. Los datos recolectados sugieren que cambios dependientes del mercaptoetanol ocurren durante este período.

BIBLIOGRAFIA

1. Borsa, J. y Graham, A. F., (1968). Reovirus: RNA Polymerase Activity in Purified Virions. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 38: 895.
2. Eagle, H., (1959). Amino Acid Metabolism in Mammalian Cell Cultures. *Science* 130: 432.
3. Easterbrook, K. B., (1966). Controlled Degradation of Vaccinia Virions in Vitro: An electron Microscopy Study. *J. Ultrastructure Res.* 14: 484.
4. Kates, J. R. y MacAulian, B. R., (1967). Poxvirus DNA Dependent RNA Polymerase. *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S. A.* 58: 134.
5. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J., (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Bio. Chem.* 193: 265.

6. Morosow, M. A., (1926). Die Faerbung der Paschenschen Koerperchen church Versilberung. *Bakteriol. Parasiteuk* 100: 385.
7. Munyon, W., Paoletti, E. y Grace, J. T., Jr., (1967). RNA Polymerase Activity in Purified Infectious Vaccinia Virus. *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S. A.* 58: 2280.
8. Munyon, W., Paoletti, E., Ospina, J. E. y Grace, J. T., Jr., (1968). Adenosine Phosphohydrolase Activity in Purified Vaccinia. *J. Virology.* 2(3): 167.
9. Nagington, J. y Horne, R. W., (1962). Morphological Studies of Orf and Vaccinia Viruses. *Virology* 16: 248.
10. Shatkin, A. J. y Sipe, J. B., (1968). RNA Polymerase Activity in Purified Reovirus. *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S. A.* 61: 1462.

***** ● *****