

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
Y
CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE INGENIERIA
GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

Presenta:

GABRIELA GARCIA PEREZ.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INTRODUCCION

Los rotavirus son uno de los principales agentes etiológicos de las gastroenteritis, encontrándose altos índices de morbimortalidad tanto en países en vías de desarrollo como en países desarrollados. Estos virus afectan principalmente a individuos de corta edad de muchas especies de aves y mamíferos (Estes, M. K., y col 1983; Holmes, I. A. 1983; Cukor, G. y Blaklow, N. R. 1984). En especies animales de importancia ganadera (Briden, A. S., y col 1976; McNulty, M. S. 1976; Mebus, C. A., y col 1971; Much, D., y col 1972; Tzipori, S., y col 1976), los rotavirus ocasionan grandes pérdidas económicas, debido al aumento en mortalidad y al retraso en ganancia de peso por estas infecciones.

En el hombre, los individuos mas afectados son los niños entre seis meses y dos años de edad (Espejo, R. T., y col 1981; Bishop, R. F., y col 1973). El cuadro clínico de la enfermedad es severo; con frecuencia se presentan vómito, fuerte deshidratación y deterioro general del estado nutricional (Rodriguez, W. J., y col 1983; Mebus, C. A., y col 1969; McNulty, M. S., y col 1976). En la etiología de las gastroenteritis en países desarrollados, los rotavirus ocupan los primeros lugares como causa de morbilidad infantil (O.P.S. 1983). En los países en vías de desarrollo, los rotavirus son responsables del 17% al 30% de las gastroenteritis que requieren hospitalización (Espejo, R. T., y col 1979; Kapikian, A. Z. 1980; Champsaur, H., y col 1984). Debido a que tanto en los países en vías de desarrollo, como aquellos que lo han alcanzado tienen serios problemas con estas gastroenteritis virales, con mejorar las condiciones de vida en los países sub-desarrollados, no será suficiente para eliminar las gastroenteritis causadas por estos virus debido su fácil propagación.

Los rotavirus infectan las células epiteliales que recubren la parte apical de las vellosidades del intestino delgado (Mebus, C. A., y col 1977; Thoules, M. E., y col 1979), causando su desprendimiento prematuro. Las células inmaduras que las sustituyen, provienen de las criptas y son incapaces de llevar a cabo las funciones de absorción de manera normal, produciéndose así la diarrea (Davidson, G. P., y Barnes, G. L. 1979). La diarrea se autolimita en un lapso de tres a cinco días.

Los rotavirus son partículas de 70 nanómetros de diámetro, compuestas por 11 segmentos de RNA de doble cadena de distintos tamaños, los cuales están cubiertos por una doble capa de proteínas (Helmsberg-Jones, H., y Patton J. T. 1986). La capa interna está constituida por cuatro (Liu, M., y col 1988) proteínas, denominadas VP1, VP2, VP3 y VP6. Los anticuerpos que se producen contra la proteínas VP6 de capa interna, además de ser característicos de grupo, dividen a los rotavirus en dos subgrupos (Kapikian, A. Z., y col 1981) La capa externa esta formada por dos

proteínas VP4 y VP7 con pesos moleculares de 88 y 37 Kd, respectivamente (Greenberg, H., y col 1983). Los anticuerpos contra estas proteínas definen a los rotavirus en serotipos (Wayt, R. G. y col 1984; Richardson, M. A. y col 1984; Green, K. Y. y col 1989).

La proteína VP4, denominada anteriormente VP3, es el producto del gen 4 de los rotavirus (Liu, M., y col 1988), y es la responsable del aumento de la infectividad viral causada por el tratamiento con tripsina. Al tratar a los virus con esta proteasa la proteína VP4 es cortada en dos polipéptidos: VP8, que contiene la región amino terminal de la proteína y VP5 que contiene la región carboxilo terminal (López, S., y col 1985). VP8 y VP5 tienen pesos moleculares aproximados de 28 y 60 Kd, respectivamente (Espejo, T., y col 1981; Clark, S. M., y col 1981; Estes, M. K., y col 1981). Este corte proteolítico de VP4 que provoca la activación de la infectividad del virus, ocurre durante la infección "in vivo" en el lumen intestinal, cuando los rotavirus están expuestos a las secreciones pancreáticas (Kapikian, A. Z., y Chanok, R. M. 1985). Una de las explicaciones que se le ha dado al aumento de la infectividad viral cuando los rotavirus se tratan con tripsina es que uno de las regiones terminales recién generadas al cortarse VP4, de alguna manera aún no conocida, facilita la penetración del virus a través de la membrana celular (Kaljot, K. T., y col 1988), de manera similar a como sucede con algunos mixo y paramixovirus (Richardson, C. D., y col 1980). Por otro lado, se ha visto que la región comprendida entre los amino ácidos 384 y 401 de VP4, es similar a la secuencia de amino ácidos (amino ácidos 75 al 92) de la proteína E1 del virus de Sindbis, la cual posiblemente esté involucrada en la fusión de la membrana del virus a la célula huésped (Mackow, y col 1988a). Recientemente la proteína VP4 se ha asociado con la inducción de anticuerpos neutralizantes específicos de serotipo (homotípicos) así como de anticuerpos neutralizantes que neutralizan a más de un serotipo (heterotípicos) (Ward, R. L., y col 1988; Offit, P. A., y col 1986; Hoshino, Y. M. M., y col 1985; Mackow, R.D., y 1988a).

Por su parte, VP7 es el producto de traducción del gene 7, 8, ó 9, dependiendo la cepa de rotavirus (Mason, B., y col 1983; Arias, F. C., y col 1984), y es la proteína más abundante de la capa externa y contra la cual se producen la mayor parte de los anticuerpos neutralizantes específicos de serotipo (Kalika, A. R., y col 1981; Greenberg, H. B., y col 1983; Both, G. W., y col 1983; Dyal-Smith, M. L., y col 1986; Green K, I., y col 1989). VP7 está glicosilada con azúcares de alta manosa (Espejo, R. T., y col 1981; Arias, C., y col 1982) y es la responsable de la unión del virus al receptor celular (Sabara M., y col 1985; Fukuhara, M., y col 1988), función en la cual parecen no intervenir los azúcares de la glicoproteína VP7. Sin embargo, la glicosilación de VP7 parece ser importante para mantener la conformación, ya que el reconocimiento inmune de la proteína al no estar glicosilada, algunos de los anticuerpos dirigidos contra el virus nativo no la reconocen (Sabara, M., y col 1988; Caust, I., y col 1987).

La evidencia que se ha obtenido hasta ahora indica que la protección contra la diarrea por rotavirus está mediada por anticuerpos neutralizantes en el lumen intestinal (Bohl, E. H. 1979; McLean, B., y Holmes I. H. 1981), y que los anticuerpos séricos tienen una participación limitada (Organización Panamericana de la Salud 1983). Sin embargo, algunos estudios muestran que niveles de anticuerpos séricos altos correlacionan con la protección contra la infección por rotavirus (Chiba, y col 1986).

Las proteínas de la capa externa de los rotavirus están involucradas en la inducción de anticuerpos capaces de neutralizar la infectividad del virus (Hoshino, Y., y col 1985; Offit, P. A., y col 1986a y 1986b). Se han llevado a cabo análisis tanto funcionales como topográficos de los epítomos presentes en las proteínas VP4 y VP7 de las cepas de rotavirus aisladas de humanos y de simio (Burns, Y col 1988; Shaw, R., y col 1986; Taniguchi, K. y col 1987; Dyall-Smith, M. L., y col 1986). Estos estudios han mostrado la existencia de tres diferentes sitios antigénicos en VP7 y de tres a seis sitios antigénicos en VP4. Recientemente se ha obtenido una información más detallada acerca de la localización de los determinantes antigénicos de neutralización a través del análisis de las secuencias del gen 4 ó 9, derivadas de variantes antigénicos de rotavirus que son resistentes a la neutralización por anticuerpos monoclonales seleccionados (Dyall-Smith, M. L., y col 1986; Taniguchi, K., y col 1988; Mackow, R. E., y col 1988a).

En el caso de VP7, los amino ácidos identificados, que permiten el escape a la neutralización por los anticuerpos monoclonales neutralizantes empleados, pueden agruparse en tres regiones antigénicas. Estas regiones se encuentran localizadas entre los amino ácidos 87-101, 143-152 y 208-221 (Dyall-Smith, M. L., y col 1986). Por otro lado, al analizar variantes del gene 4 del rotavirus de simio RRV, Mackow, E. R., y col (1987) encontraron que las regiones de VP4, antigénicamente importantes en la neutralización, están localizadas entre los amino ácidos 87-114, 148-150, 388-393, y alrededor de los amino ácidos en las posiciones 135, 173 y 188. En otro estudio Taniguchi, K., y col 1987 y 1988 analizando variantes antigénicas de un rotavirus humano, encontraron tres regiones involucradas en la interacción con anticuerpos monoclonales neutralizantes. La primera de estas, del amino ácido 388 al 393 corresponde con una de las reportadas para el rotavirus de simio RRV. Además encontraron otra zona antigenicamente importante entre los amino ácidos 433-439, y una tercera alrededor del amino ácido 305. Es importante mencionar para el caso de VP4, que a pesar del hecho de que las mutantes identificadas de las variantes antigénicas estudiadas (que permitían el escape a la neutralización de anticuerpos monoclonales) se encuentran distribuidas a lo largo de la región del gen 4, tanto en la región de VP8 como VP5. Sin embargo, no se identificaron mutantes en o cerca del sitio de corte con tripsina que al generar los polipéptidos VP8 y VP5 esta involucrado con la activación del virus (López, S., y col 1985).

Los genes que codifican para las proteínas de superficie de los rotavirus han sido clonados y expresados en sistemas tanto procariontes como eucariontes (Arias, C. F., y col 1986; Arias, C. F., y col 1987; McCrae M. A., y McCorquodale, J.C. 1987). Las proteínas obtenidas han sido capaces de inducir anticuerpos que neutralizan al virus "in vitro". Un segmento de la proteína VP4, que contiene la región de VP8 y parte del polipéptido VP5, induce anticuerpos que son capaces tanto de neutralizar la infección viral, como de inhibir la hemaglutinación viral (Arias, C. F., y col 1987).

El uso de péptidos sintéticos ha representado una buena alternativa para estudiar y conocer mejor las regiones de las proteínas involucradas en la inducción de la respuesta inmune por algunos agentes patógenos de gran importancia médica y ganadera, tanto para entender los mecanismos celulares comprometidos en la respuesta inmunológica, como para implementar medidas profilácticas de vacunación que tengan un menor riesgo que el que las vacunas convencionales presentan (Etlinger, H., y col 1988a y b; Parry N. R., y col 1988 Herrington D.A., y col 1987 Milich, D. R., y col 1987; Krausslich, H. G., y col 1989). Algunos péptidos sintéticos han sido capaces de inmunopotenciar la respuesta inmune, aún cuando no generen una respuesta de anticuerpos por sí mismos. Así al entrar los animales primoinmunizados en contacto con la proteína nativa de donde se generó el péptido, se observa una respuesta de tipo secundaria hacia el epítipo representado en el péptido (Emini, E. A., y col 1983; Francis, M. S., y col 1985a y b; Jacob, CH. O., y col 1986).

Para el caso de las proteínas de los rotavirus, se han reportado algunos trabajos en los cuales por medio de péptidos sintéticos, ha sido posible obtener anticuerpos capaces de reconocer a la proteína de la cual fue copiada su secuencia (Gunn, P. R., y col 1985; Streckert, H. J., y col 1988). Sin embargo en el caso de péptidos que representan seis diferentes regiones de VP7 (amino ácidos 66-76, 90-103, 174-183, 208-225, 247-259 y 275-295), ninguno de los anticuerpos inducidos fue capaz de reaccionar con la proteína nativa, ó neutralizar la infectividad del virus (Gunn, P. R., y col 1985). Este fallo de los péptidos por inducir anticuerpos que reaccionen en contra de la proteína nativa (tal y como se encuentra en el virus) es probablemente reflejo de la importancia que tiene la estructura tridimensional en las regiones antigenicamente importantes, como se ha sugerido (Dyall-Smith, M. L., y col 1986).

Recientemente, Streckert y col (1988) reportaron que un péptido de la proteína VP4 de rotavirus de simio, que corresponde a los amino ácidos 228-241 es capaz de inducir anticuerpos que neutralizan la infección del virus en un sistema "in vitro".

Los sitios de corte por tripsina (amino ácidos 241 y 246), responsables de la activación de la infectividad viral, están flaqueadas por dos regiones, amino ácido 222 a 232 y 257 a 270, que están altamente conservadas entre rotavirus aislados de diferentes

especies animales o pertenecientes a diferentes serotipos (Gorziglia, M., y col 1988; Mackow, R. E., y col 1988; López, S., y col 1986). Para evaluar la importancia funcional de estas dos regiones, se sintetizaron dos péptidos que representan las secuencias correspondientes del rotavirus de simio SA11 y se probó su capacidad para a) competir la infectividad viral del virus en un ensayo "in vitro", b) inducir anticuerpos neutralizantes contra el virus y c) sensibilizar el sistema inmune de ratones hacia una subsecuente exposición del virus SA11 o a rotavirus pertenecientes a otros serotipos diferentes al SA11.

Priming for Rotavirus Neutralizing Antibodies by a VP4 Protein-Derived Synthetic Peptide

CARLOS F. ARIAS,* GABRIELA GARCIA, AND SUSANA LOPEZ

Departamento de Biología Molecular, Centro de Investigaciones sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Col. Miraval, Cuernavaca, Morelos 62271, México

Received 17 April 1989; Accepted 9 August 1989

In the rotavirus SA11 surface protein VP4, the trypsin cleavage sites associated with the enhancement of infectivity are flanked by two amino acid regions that are highly conserved among different rotaviruses. We have tested the ability of synthetic peptides that mimic these two regions to induce and prime for a rotavirus neutralizing antibody response in mice. After the peptide immunization schedule, both peptides induced peptide antibodies, but neither was able to induce virus antibodies, as measured by an enzyme-linked immunosorbent assay or a neutralization assay. However, when the peptide-inoculated mice were subsequently injected with intact SA11 virus, a rapid and high neutralizing antibody response was observed in mice that had previously received the peptide comprising amino acids 220 to 233 of the VP4 protein. This neutralizing activity was serotype specific; however, this peptide was also able to efficiently prime the immune system of mice for a neutralizing antibody response to the heterotypic rotavirus ST3 when the ST3 virus was used for the secondary inoculation.

Rotaviruses, the single most important cause of acute viral gastroenteritis in the young of a number of mammalian and avian species, including humans (19), are comprised of two capsid layers that contain the viral genome composed of 11 segments of double-stranded RNA (31). The outer capsid is formed by two polypeptides (12), VP4 (formerly called VP3) and VP7, which are encoded in simian rotavirus SA11 by genome segments 4 and 9, respectively (2, 6, 22, 25).

VP7, a 37-kilodalton glycoprotein (3, 11), induces neutralizing antibodies that specify the viral serotype (5, 17) and is thought to be involved in the attachment of the virus to the host cell (26, 32). VP4, the other surface polypeptide of rotaviruses, is an 88-kilodalton protein (12, 13) that has been identified as the virus hemagglutinin (20) and has been associated with the determination of virulence *in vivo* (29). Antibodies directed at this protein neutralize the viral infectivity *in vitro* (30, 37) and passively protect mice against heterologous rotavirus challenge *in vivo* (30).

The infectivity of rotaviruses in cell culture can be increased by, and probably is dependent on, trypsin treatment (8, 13, 27). This proteolytic activation of the virus produces at least two specific cleavages on VP4 at amino acids 241 and 247 (22), generating two cleavage products, VP5 (60 kilodaltons) and VP8 (28 kilodaltons). These specific cleavages probably mediate penetration of the virion into the cell (14).

Functional and topographical analyses of epitopes on the VP4 polypeptide of simian and human rotaviruses have been carried out (7, 33, 36). These studies have shown the existence of three to six different antigenic sites on the protein. More detailed information has been obtained by sequence analysis of genes 4, derived from rotavirus antigenic variants resistant to neutralization by selected monoclonal antibodies (24, 35). It is of interest that despite the fact that the neutralization escape mutations identified were spread broadly over the coding region of VP8 and were also

located on VP5, no mutants were identified in or near the trypsin cleavage sites (24, 35).

The two trypsin cleavage sites are flanked by two regions, amino acids 222 to 232 and 257 to 270, that are highly conserved among rotaviruses isolated from different animal species or belonging to different serotypes (16, 21, 23, 24). To evaluate the functional relevance of these two regions, we made synthetic peptides representing the corresponding sequences of SA11 rotavirus and tested their capacity to induce neutralizing antibodies to the virus and to prime the immune response of mice for a subsequent exposure to the complete virion.

MATERIALS AND METHODS

Virus and cells. Simian rotavirus SA11 (strain SA114FM [23]) was originally obtained from H. H. Malherbe, Gull Laboratories, Salt Lake City, Utah. Human rotaviruses Wa, S2, and ST3 were obtained from Y. Hoshino, National Institutes of Health, Bethesda, Md. All rotavirus strains were grown in MA104 cells and purified as previously described (12). Essentially, after Freon extraction and polyethylene glycol precipitation of the infected cell lysates, the virions were separated by centrifugation in a linear sucrose gradient.

Choice and synthesis of peptides. The VP4 protein-derived peptides represented amino acid regions 220 through 233 (peptide VP4-1) and 258 through 271 (peptide VP4-2). These regions, which flank the trypsin cleavage sites associated with the enhancement of rotavirus infectivity, are highly conserved among different rotaviruses. As a negative control, we used peptide VP7-1, which comprises amino acids 211 through 223 of the SA11 VP7 protein and has been shown by others not to induce neutralizing antibodies (18).

Solid-phase peptide synthesis was conducted by the Barany and Merrifield method (4) with a 1% cross-linked divinylbenzene resin esterified to the appropriate *t*-butoxycarbonyl amino acid and suitably protected *t*-butoxycarbonyl amino acids from Peninsula Laboratories (22). Amino

* Corresponding author.

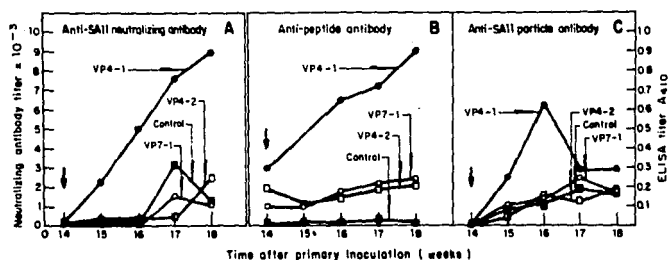


FIG. 1. Analysis of the secondary response to SA11 virus of mice primed with synthetic peptides. The ELISA and neutralizing antibody titers shown represent the geometric means of the analyzed sera. Shown are (A) neutralizing, (B) peptide, and (C) virus particle antibody responses of mice primed with synthetic peptide VP7-1 (○), VP4-1 (●), or VP4-2 (□) or no peptide (■) and boosted (↑) 14 days later with SA11 virus. In panel B, the peptide antibody in the control group was assayed with all three peptides, with similar results.

acid analysis of the resulting products on a Durrum D-500 amino acid analyzer confirmed that all three peptides had the predicted composition.

Coupling of the peptides to BSA. The peptides were coupled to bovine serum albumin (BSA; Pentax) as follows. BSA (40 mg) was added to 5 mg of peptide in 2.5 ml of twice-distilled water. Then 250 mg of 3,3-dimethylcarbodiimide in 1.5 ml of water was added dropwise, and the mixture was stirred for 6 h at 30°C and kept at -20°C until use.

Cross-linking of peptides with glutaraldehyde. A solution of glutaraldehyde was added dropwise to 4 mg of peptide in 1 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.6) until a final concentration of 0.25% was reached. This mixture was stirred for 4 h at room temperature, and then glycinamide was added to 0.025 M. After further stirring for 30 min, the aggregated peptides were kept at -20°C until use.

Immunization schedule. Male BALB/c mice 7 to 9 weeks of age were screened on day 0 for neutralizing antibodies to SA11 rotavirus as described below. Those mice whose preimmune sera at dilutions of 1:50 failed to neutralize SA11 were divided into groups of five and were immunized each with 100 µg of the corresponding peptide, cross-linked with glutaraldehyde. All mice were injected subcutaneously with 200 µl of an emulsion of the respective antigen and adjuvant. Freund complete adjuvant was used for the first immunization; for subsequent injections, incomplete adjuvant was used. Mice in the control groups (which did not receive peptide) were injected with an emulsion of saline solution and the corresponding adjuvant. The mice in the various groups received seven injections on weeks 0, 2, 4, 6, 8, 10, and 12. Mice were bled on weeks 0, 3, 5, 7, 9, 11, and 13. On week 14, 15 days after the last peptide or mock administration, a single dose of the corresponding purified rotavirus strain (50 µg) was given subcutaneously and intramuscularly, and the mice were bled every week during the next 4 to 5 weeks. All collected sera were heat inactivated at 56°C for 1 h and stored at -20°C.

Neutralizing antibody assay. Neutralizing antibody titers in mouse sera were measured by an immunochemical focus reduction neutralization test (1). The titer of neutralizing antibody in a serum sample was defined as the highest serum dilution at which a reduction of at least 60% in the number of infected cells was observed as compared with controls in which phosphate-buffered saline (PBS) had been used instead of serum.

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Samples of

50 µl of BSA-coupled peptides (10 µg/ml) in carbonate buffer (0.05 M carbonate-bicarbonate (pH 9.6)) were placed in each well of Immulon 1 96-well plates (Dynatech Laboratories, Inc.) and incubated at room temperature overnight. The plates were washed three times with PBS-1% Tween 20 (PBS-T) and then postcoated with 250 µl of 3% BSA in PBS-T for 2 h at 37°C. After the plates were washed three times with PBS-T, 100 µl of each serum, diluted 1:100 in PBS, was placed in each peptide-coated well for 3 h at 37°C. The plates were then washed three times with PBS-T, and the presence of peptide antibodies was detected as follows. Goat anti-mouse immunoglobulin G conjugated to alkaline phosphatase (100 µl, diluted 1:500 in PBS-T; Miles Laboratories, Inc.) was added to each well, and the plates were incubated for 2 h at 37°C. After three washes in PBS-T, the substrate *p*-nitrophenyl phosphate (104 alkaline phosphatase substrate; Sigma Chemical Co.) (1 mg/ml in diethanolamine buffer (pH 9.8)) was added. After 30 min at 37°C, the reaction was stopped with 50 µl of 3 M NaOH, and the optical density was measured at 410 nm. Zero calibration was performed by using the optical density value of wells incubated with the corresponding preimmune serum.

For detection of viral particle antibodies, a volume of 100 µl of guinea pig anti-SA11 rotavirus hyperimmune serum (neutralizing antibody titer of 1:6,800), diluted 1:500 in carbonate buffer (pH 9.6) was placed in each well of Immulon 1 96-well plates and incubated at 4°C overnight. The plates were washed three times as above, and each well was incubated with 100 µl of purified SA11 rotavirus (94 ng/ml) in buffer (0.15 M NaCl, 0.001 M MgCl₂ · 6H₂O, 0.01 M Tris hydrochloride (pH 8.2)) for 2 h at 37°C. The plates were washed with PBS-T, the wells were coated with 250 µl of 3% BSA in PBS-T, and then the plates were incubated with 100 µl of the corresponding serum sample diluted 1:100 in PBS-T for 2 h at 37°C. After the plates were washed with PBS-T, the presence of viral particle antibodies was detected as mentioned above.

RESULTS

Induction and priming for anti-SA11 neutralizing antibodies by synthetic peptides. Four groups of five mice each were immunized with 100 µg of either peptide VP4-1, VP4-2, or VP7-1 or with adjuvant alone. By the end of the immunization schedule, low levels of the corresponding peptide antibody were detected in the mice immunized with the peptides (Fig. 1B). However, these antibodies did not react with the

TABLE 1. Specificity of the neutralizing antibody induced by SA11 and ST3 viruses in mice primed with peptide VP4-1

Rotavirus (serotype)	Neutralizing antibody titer of sera from mice boosted with the indicated rotavirus ^a						
	SA11			ST3			
	2 (17) ^b	3 (18)	4 (17)	5 (18)	1 (19)	2 (19)	3 (19)
Wa (1)	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50
S2 (2)	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50
SA11 (3)	12,800	25,000	6,400	12,800	400	200	200
ST3 (4)	100	100	100	400	6,400	25,000	12,800

^a Titers are expressed as the reciprocal of the highest dilution of the serum that neutralized at least 60% of the immunoperoxidase foci in the assay. For this assay, the mouse sera with the highest neutralization titers were used.

^b Numbers within parentheses indicate the week of collection.

virus in an ELISA and did not have neutralizing activity against the SA11 virus (Fig. 1A and C).

It has been reported that selected synthetic peptides of poliovirus, despite the fact that they do not induce neutralizing antibodies by themselves, are able to efficiently and specifically prime the immune systems of rabbits for an enhanced neutralizing antibody response after a subsequent inoculation of intact virus (10). On the other hand, it has been shown that synthetic peptides containing only T-helper cell determinants are able to prime the immune response of animals for an enhanced antibody response to several epitopes of the microorganism (15, 28).

To determine whether the synthetic rotavirus peptides were capable of priming a neutralizing antibody response to SA11 virus, the mice in all four groups were inoculated with 50 µg of purified SA11 particles after the peptide immunization schedule had been completed. At 2 weeks after inoculation with the SA11 virions, the virus particle and neutralizing antibody responses of mice in the groups that had previously received peptides VP4-2 and VP7-1 were comparable with the response observed in the control group (which had not been immunized with peptides), whereas the response in the group that initially received peptide VP4-1 was at least 4 and 20 times higher for virus particle and neutralizing antibodies than the control group, respectively (Fig. 1). Interestingly, the titer of peptide antibodies in the VP4-2 and VP7-1 groups did not increase significantly after immunization with the SA11 particles, whereas the peptide VP4-1 antibody titer had a threefold increase. This observation is compatible with the fact that anti-SA11 virus hyperimmune sera did not recognize any of the peptides in an ELISA (data not shown), suggesting that the peptide VP4-1 antibody response observed after inoculation with the virus is the result of specific stimulation of peptide-induced memory B cells by the virus particles.

Specificity of the secondary response. Since the amino acid region represented in peptide VP4-1 was selected for being highly conserved among rotavirus strains belonging to different serotypes, we tested selected sera from mice of the group that had received peptide VP4-1 and had been reinoculated with the virus particles for the ability to neutralize rotaviruses of different serotypes. The sera analyzed had no neutralizing activity against the human rotaviruses Wa (serotype 1) and S2 (serotype 2), whereas they had a low but significant neutralization titer against human rotavirus ST3, which belongs to serotype 4 (Table 1).

Heterotypic priming with peptide VP4-1. The secondary, serotype-specific neutralizing antibody response observed after inoculation of the SA11 particles in mice that had

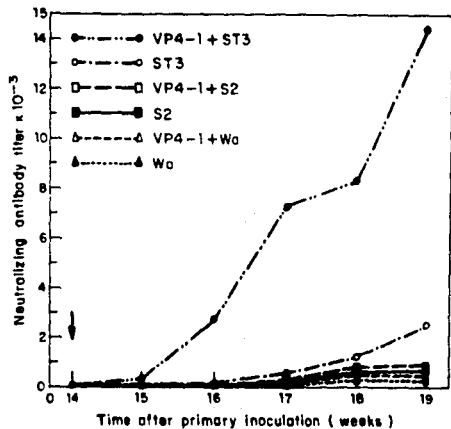


FIG. 2. Neutralizing antibody response to Wa, S2, and ST3 rotavirus strains of mice primed with peptide VP4-1. The neutralizing antibody titers represent the geometric means of the analyzed sera. Mice were primed with synthetic peptide VP4-1 (●, □, △) or no peptide (○, ■, ▲) and boosted (1) 14 days later with Wa (▲, △), S2 (■, □), or ST3 (○, ●).

previously received peptide VP4-1 did not necessarily imply that this peptide would not be able to prime an antibody response to viruses of serotypes different from SA11. Therefore, we tested this possibility by immunizing three groups of five mice with peptide VP4-1. Three control groups were inoculated with adjuvant alone. At the end of the peptide immunization schedule, one group that had received the peptide and one control group were inoculated with 50 µg of either Wa, S2, or ST3 purified rotavirus strains, and neutralizing antibodies to the corresponding inoculated rotavirus strain were determined during the 5 following weeks. The neutralizing antibody response to Wa and S2 rotaviruses was not influenced by the previous administration of peptide VP4-1 (Fig. 2). However, the neutralizing antibody titers to rotavirus ST3 were much higher in the mice that had been immunized with peptide VP4-1 than in the control mice that did not receive the peptide, indicating that the SA11-derived synthetic peptide was able to prime a neutralizing immune response to rotavirus ST3. Again, the secondary antibody response was highly specific for the strain used for reinoculation, with only a low neutralization activity against rotavirus SA11 (Table 1).

DISCUSSION

In this work we present evidence that the region between amino acids 220 and 233 is able to prime for a neutralizing antibody immune response to SA11 and ST3 rotavirus strains. This region is highly conserved among different rotaviruses and is very close to the trypsin cleavage sites identified by López et al. (22) at amino acid positions 241 and 247.

Recently, Streckert et al. (34) reported that a synthetic peptide (amino acids 228 to 241) corresponding to the cleavage region of the rotavirus SA11 VP5 protein was able to induce neutralizing antibodies. The sequence contained in

that peptide overlaps by six amino acids the sequence of peptide VP4-1 (amino acids 220 to 233) described in this work. Since in our hands peptides containing amino acids 231 to 241 and 231 to 247 of the SA11 VP4 protein were unable to induce neutralizing antibodies by themselves or to prime the immune system of mice, it is tempting to suggest that the overlapping region between the two peptides (amino acids 228 to 233) might be responsible for the observed priming effect.

It is interesting to note that amino acid 231 in the SA11 VP4 protein is an arginine (22), which is absolutely conserved in all sequenced VP4 proteins from different rotavirus strains (16, 21, 23, 24) and which represents a potential trypsin cleavage site that would have not been identified by the NH₂-terminal sequence analysis of the VP4 trypsin cleavage products carried out by López et al. (22), since cleavage at positions 241 and 247 would have removed the potential NH₂ terminus generated by cleavage at arginine 231. If this were the case, the peptide VP4-1 would very closely resemble the newly generated carboxy terminus after trypsin activation of the virus.

Escape mutations to neutralization by VP4-specific neutralizing monoclonal antibodies have been recently mapped to three and six different regions in human and rhesus rotaviruses, respectively (24, 35). The three neutralization domains identified in human rotaviruses were located to VP5, the carboxy-terminal trypsin cleavage product of VP4, whereas five of the six neutralization domains of rhesus rotavirus were located to VP8, the NH₂-terminal trypsin cleavage product. As a result, only one neutralization domain seems to be shared (around amino acids 392 and 393) by the two sets of neutralizing antibodies used for the selection of the analyzed escape mutants. It is interesting that none of the escape mutations was mapped in or near the two trypsin cleavage sites associated with the enhancement of rotavirus infectivity. These results would suggest that the neutralizing antigenic determinants in the trypsin cleavage region (like the one reported by Streckert et al. [34]) are less immunopotent than other regions of VP4. However, the absence of escape mutations in this region of the VP4 protein of rhesus and human rotaviruses could also be explained if either of the neutralization epitopes contained within this region was only present in some rotavirus strains. This kind of strain-specific epitope has been described in poliovirus, for which there is a serotype 1-specific epitope that is not present in the other poliovirus serotypes (10).

The enhanced neutralizing antibody response observed after immunization with SA11 virus of mice that had previously received peptide VP4-1 was shown to be specific for SA11, although a minor cross-neutralization was observed with ST3 virus. However, this peptide was able to prime the mice immune system very efficiently for an ST3-specific neutralizing antibody response when the secondary inoculation was done with the ST3 virus. An analogous finding was reported by Emimi et al. (9), who showed that poliovirus-specific synthetic peptides were able to prime for hepatitis A neutralizing antibody upon exposure of primed rabbits to hepatitis A virus. However, the low neutralizing activity against poliovirus, induced directly by the peptides, was not increased upon inoculation with the hepatitis A virus.

The serotype-specific priming for rotavirus neutralizing antibody could be explained if we consider that the viral epitope(s) responsible for the priming could be present in slightly different conformations in ST3 and SA11 viruses. If the peptide is able to activate a set of B or T-helper cells specific for many different conformations of the peptide,

ROTAVIRUS STRAIN (serotype)	VP4 AMINO ACID SEQUENCE
	220 233
(3) SA11	I M N G L P P I Q N T R N I
(1) Wa	-----V
(2) DS1	-----V
(4) ST3	- - T - - - M - - - -

FIG. 3. Comparison of the SA11 VP4 amino acid sequence (amino acids 220 to 233) with the corresponding regions of rotavirus strains of different serotypes. The amino acid sequences from Wa, DS1, and ST3 (16) were compared with the amino acid sequence of SA11 (22). Dashes indicate identical amino acids.

then the immune system would be primed to respond to a subsequent exposure to either SA11 or ST3 virus, but the neutralizing antibodies elicited by any one of the viruses would be specific for the inoculated strain.

When we compared the sequences of the region at amino acids 220 through 233 among the virus strains used in this work (Fig. 3), it was interesting to note that the ST3 virus has two amino acid changes as compared with the SA11 virus, whereas the Wa strain, which was not primed by the peptide, has only one amino acid change. The sequence of S2 virus has not been reported, but the sequence of DS1, which is also a serotype 2 virus, has also only one change with respect to the SA11 sequence. It is of note that the single amino acid change between either Wa or DS1 and SA11 is in position 233, whereas the amino acids that differ between SA11 and ST3 are at positions 228 and 227, with the sequence between amino acids 228 to 233 being identical between the two strains. This observation is consistent with the idea that the region at amino acids 228 through 233 might be responsible for the priming effect observed. However, this does not rule out the possibility that some other region of the peptide, comprising the amino acid differences mentioned, could be the responsible for the priming of neutralizing antibodies to ST3 and SA11, since the amino acid 388 of VP4, whose change allows the rhesus rotavirus variant M2 to escape from neutralization by monoclonal antibody M2, is different in rotavirus Wa, which is also neutralized by monoclonal antibody M2 (24). On the other hand, the region within the peptide that primes for SA11 and ST3 neutralizing antibodies might be different.

The fact that the inoculation of SA11 virus into animals primed with peptide VP4-1 caused an increase in the peptide antibody titer, as determined by the ELISA, is suggestive that at least one B-cell epitope is shared by VP4, as it is in the virion, and peptide VP4-1. In addition, the observation that peptide VP4-1 was able to prime for a neutralizing immune response in the absence of a carrier protein indicates that this peptide can initiate its own T-helper cell response and suggests that it contains, in addition to a B-cell epitope(s), a T-cell determinant.

Several investigators (15, 28) have described a priming effect mediated by a T-helper cell epitope that was present in the same protein or another protein of the same microorganism. Therefore, the mechanism through which peptide VP4-1

is able to prime for a neutralizing antibody immune response to rotaviruses SA11 and ST3 remains an open question, and further experiments should be performed before the responsibility for the priming effect can be assigned to a B- or T-cell epitope.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ernesto Méndez for excellent technical assistance and Georgina Gurrola and Fernando Zamudio for the cleavage of the peptides and the amino acid analysis.

This work was partially supported by grant PVT-AI/NAL/85-3027 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico, and by grant RF87049, #26 from the Rockefeller Foundation.

LITERATURE CITED

- Arias, C. F., M. Lizano, and S. López. 1987. Synthesis in *Escherichia coli* and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage sites associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *J. Gen. Virol.* **68**: 633-642.
- Arias, C. F., S. López, J. R. Bell, and J. H. Strauss. 1984. Primary structure of the neutralization antigen of simian rotavirus SA11 as deduced from cDNA sequence. *J. Virol.* **50**: 657-661.
- Arias, C. F., S. López, and R. T. Espejo. 1982. Gene protein products of SA11 simian rotavirus genome. *J. Virol.* **41**:42-50.
- Barany, G., and R. B. Merrifield. 1980. Solid phase peptide synthesis. p. 1-284. *In* E. Gross and J. Meienhofer (ed.), *The peptides: analysis, synthesis and biology*, vol. 2. Academic Press, Inc., New York.
- Bastardo, J. W., J. L. McKimm-Breschkin, S. Sonza, L. D. Mercer, and I. H. Holmes. 1981. Preparation and characterization of antisera to electrophoretically purified SA11 virus polypeptides. *Infect. Immun.* **34**:641-647.
- Both, G. W., J. S. Mattick, and A. R. Bellamy. 1983. The serotype-specific glycoprotein of simian-11 rotavirus: coding assignment and gene sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:3091-3095.
- Burns, J. W., H. B. Greenberg, R. D. Shaw, and M. K. Estes. 1988. Functional and topographical analysis of epitopes on the hemagglutinin (VP4) of the simian rotavirus SA11. *J. Virol.* **62**:2164-2172.
- Clark, S. M., J. R. Roth, M. L. Clark, B. B. Barnett, and R. S. Spendlove. 1981. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of action. *J. Virol.* **39**:816-822.
- Emimi, E. A., J. Berger, J. V. Hughes, S. W. Mitra, and D. L. Linemeyer. 1985. Priming of anti-hepatitis-A virus antibody response by poliovirus-specific synthetic peptides: localization of potential antigenic sites of hepatitis-A virus neutralization. p. 217-220. *In* R. A. Lerner, R. M. Chanock, and F. Brown (ed.), *Vaccines 85*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Emimi, E. A., B. A. Jameson, and E. Wimmer. 1983. Priming and induction of anti-poliovirus neutralizing antibodies by synthetic peptides. *Nature (London)* **304**:699-703.
- Ericson, B. L., D. Y. Graham, B. B. Mason, H. H. Hanssen, and M. K. Estes. 1983. Two types of glycoprotein precursors are produced by the simian rotavirus SA11. *Virology* **127**:320-332.
- Espejo, R. T., S. López, and C. F. Arias. 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* **37**:156-160.
- Estes, M. K., D. Y. Graham, and B. B. Mason. 1981. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J. Virol.* **39**:879-888.
- Fukuhara, N., O. Yoshie, S. Kitaoka, and T. Konno. 1988. Role of VP3 in human rotavirus internalization after target cell attachment via VP7. *J. Virol.* **62**:2209-2218.
- Good, M. F., W. L. Malloy, M. N. Lunde, H. Margalit, J. L. Corzette, G. L. Smith, B. Moss, L. H. Miller, and J. A. Berzofsky. 1987. Construction of synthetic immunogen: use of new T-helper epitope on malaria circumsporozoite protein. *Science* **235**:1094-1092.
- Gorziglia, M., K. Green, K. Nishikawa, K. Taniguchi, R. Jones, A. Z. Kapikian, and R. M. Chanock. 1988. Sequence of the fourth gene of human rotaviruses recovered from asymptomatic or symptomatic infections. *J. Virol.* **62**:2978-2984.
- Greenberg, H. B., J. Valdesuso, K. Van Wyke, K. Midhoun, M. Walsh, V. McAuliffe, R. G. Wyatt, A. R. Kalica, J. Flores, and Y. Hoshino. 1983. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J. Virol.* **47**:267-275.
- Gunn, P. G., F. Sato, K. F. H. Powell, R. A. Bellamy, J. R. Napier, D. R. K. Harding, W. S. Hancock, L. J. Siegmán, and G. W. Both. 1985. Rotavirus neutralizing protein VP7: antigenic determinants investigated by sequence analysis and peptide synthesis. *J. Virol.* **54**:791-797.
- Holmes, I. H. 1983. Rotaviruses, p. 359-423. *In* W. K. Joklik (ed.), *The Reoviridae*. Plenum Publishing Corp., New York.
- Kalica, A. R., J. Flores, and H. B. Greenberg. 1983. Identification of the rotaviral gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation. *Virology* **125**:194-205.
- Kanharidis, P., M. L. Dyall-Smith, and I. H. Holmes. 1987. Marked sequence variation between segment 4 genes of human RV-5 and simian SA11 rotaviruses. *Arch. Virol.* **93**:111-121.
- López, S., C. F. Arias, J. R. Bell, J. H. Strauss, and R. T. Espejo. 1985. Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology* **144**:11-19.
- López, S., C. F. Arias, E. Méndez, and R. T. Espejo. 1986. Conservation in rotaviruses of the protein region containing the two sites associated with trypsin enhancement of infectivity. *Virology* **154**:224-227.
- Mackow, E. R., R. D. Shaw, S. M. Matsui, P. T. Vo, M. Dang, and H. B. Greenberg. 1988. The rhesus rotavirus gene encoding VP3: location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:645-649.
- Mason, B. B., D. Y. Graham, and M. K. Estes. 1983. Biochemical mapping of the simian rotavirus SA11 genome. *J. Virol.* **46**:413-423.
- Matsuno, S., and S. Inouye. 1983. Purification of an outer capsid glycoprotein of neonatal calf diarrhea virus and preparation of its antisera. *Infect. Immun.* **39**:155-158.
- Matsuno, S., S. Inouye, and R. Kono. 1977. Plaque assay of neonatal calf diarrhea virus and the neutralizing antibody in human sera. *J. Clin. Microbiol.* **5**:3-4.
- Milich, D. R., A. McLachlan, G. B. Thornton, and J. L. Hughes. 1987. Antibody production to the nucleocapsid and envelope of the hepatitis B virus primed by a single synthetic T cell site. *Nature (London)* **329**:547-549.
- Offit, P. A., G. Blavat, H. B. Greenberg, and F. H. Clark. 1986. Molecular basis of rotavirus virulence: role of gene segment 4. *J. Virol.* **57**:46-49.
- Offit, P. A., R. D. Shaw, and H. B. Greenberg. 1986. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to surface proteins VP3 and VP7. *J. Virol.* **58**: 700-703.
- Rodger, S. M., and I. H. Holmes. 1979. Comparison of the genomes of simian, bovine, and human rotaviruses by gel electrophoresis and detection of genomic variation among bovine isolates. *J. Virol.* **30**:839-846.
- Sabara, M., J. E. Gilchrist, G. R. Hudson, and L. A. Bahiuk. 1985. Preliminary characterization of an epitope involved in neutralization and cell attachment that is located in the major bovine rotavirus glycoprotein. *J. Virol.* **53**:58-66.
- Shaw, R. D., P. T. Vo, P. A. Offit, B. S. Coulson, and H. B. Greenberg. 1986. Antigenic mapping of the surface proteins of rhesus rotavirus. *Virology* **155**:434-451.
- Streichert, H., H. Bräusow, and H. Werchau. 1988. A synthetic peptide corresponding to the cleavage region of VP3 from rotavirus SA11 induces neutralizing antibodies. *J. Virol.* **62**: 4265-4269.
- Taniguchi, K., W. L. Maloy, K. Nishikawa, K. Y. Green, Y.

- Hoshino, S. Urasawa, A. Z. Kapikian, R. M. Chanock, and M. Gorziglia. 1988. Identification of cross-reactive and serotype 2-specific neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus. *J. Virol.* 62:2421-2426.
36. Taniguchi, K., Y. Morita, T. Urasawa, and S. Urasawa. 1987. Cross-reactive neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus: analysis with monoclonal antibodies and antigenic variants. *J. Virol.* 61:1726-1730.
37. Taniguchi, K., S. Urasawa, and T. Urasawa. 1985. Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reactivity patterns to human rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 66:1045-1053.

DISCUSION.

En este trabajo analizamos la capacidad de dos péptidos de la proteína VP4 del rotavirus SA11 de inducir anticuerpos neutralizantes o de sensibilizar el sistema inmune de ratones para una respuesta aumentada de anticuerpos neutralizantes ante un posterior contacto con el virus completo. Como control se utilizó un péptido de VP7, el cual había sido previamente demostrado por nosotros que no inducía anticuerpos neutralizantes. Las secuencias de amino ácidos representadas en los péptidos de VP4 están altamente conservadas entre las proteínas homólogas de rotavirus pertenecientes a serotipos distintos. Estas secuencias se muestran en la figura 1D.

Los tres péptidos empleados fueron capaces de inducir anticuerpos contra ellos mismos, medidos por ELISA. Sin embargo, cuando se analizó la capacidad de estos anticuerpos para neutralizar al virus SA11, encontramos que ninguno de ellos, de manera conclusiva, neutralizó al virus SA11 en un ensayo de reducción de focos infecciosos. Aunque se obtuvieron niveles bajos de anticuerpos neutralizantes inducidos por los péptidos VP4-1 y VP4-2, la variabilidad intrínseca del ensayo no permite concluir sobre la capacidad de estos péptidos para inducir anticuerpos neutralizantes per se.

Por otro lado, cuando los ratones que habían recibido los péptidos fueron subsecuentemente inmunizados con el virus SA11 completo, se encontró una respuesta de anticuerpos neutralizantes rápida y de mayor magnitud, en el grupo de inmunización que había recibido el péptido VP4-1 ($P < 0.01$ por la prueba t de students, analizando diferencias de muestras pareadas) con respecto a los grupos de inmunización que recibieron los péptidos VP4-2 y VP7-1, así como a los grupos controles. (fig 1-A del artículo).

Respuestas similares a la obtenida por nosotros han sido reportadas para otros sistemas con péptidos que mimetizan regiones de las proteínas del virus de polio (Emili. E., y col 1985), el virus de la fiebre aftosa (Francis. M. J., y col 1985) y para la toxina de cholera (Jacob, O. C., y col 1986). En todos estos trabajos se han obtenido anticuerpos neutralizantes después de administrar una sola dosis de la proteína nativa o el agente patógeno, subsecuentemente a la administración del péptido sintético correspondiente, aún cuando algunos de los péptidos no fueron capaces de inducir anticuerpos neutralizantes por sí solos. Esto pudiera deberse a que los péptidos pueden activar las células de memoria del sistema inmune, pero son incapaces de inducir una respuesta de anticuerpos por sí mismos. Una posible explicación podría ser que la frecuencia con que el péptido adopta una conformación similar a la que tiene esa secuencia en el virus o en

FIGURA 1D.

COMPARACION DE LAS SECUENCIAS DE AMINOACIDOS DE LA PROTEINA VP4, CORRESPONDIENTE A LA REGION DEL PEPTIDO VP4-1 (aa 219 al 234), Y DEL PEPTIDO VP4-2 (aa 257 al 272), EN VARIOS SEROTIPOS DE ROTAVIRUS.

SEROTIPO	VIRULENCIA*	ROTAVIRUS	SECUENCIA DE AMINOACIDOS DEL PEPTIDO VP4-1**														
3	?	SA11	Y	I	N	G	L	P	P	I	Q	N	T	R	N	I	V
3	+	RRV															
3	+	P															
4	+	VA70															V
2	+	DS1															V
2	+	Hu/5															V
1	+	Wa															V
3	-	McN						T									M
4	-	ST3						T									M
2	-	1076						T									M
1	-	M37						T									M

SEROTIPO	VIRULENCIA*	ROTAVIRUS	SECUENCIA DE AMINOACIDOS DEL PEPTIDO VP4-2**														
3	?	SA11	K	T	S	L	W	K	E	M	Q	Y	N	R	D	I	V
3	+	RRV															I
3	+	P															I
4	+	VA70															I
2	+	DS1															I
2	+	Hu/5															I
1	+	Wa															I
3	-	McN															I
4	-	ST3															I
2	-	1076															I
1	-	M37															I

(**)Las secuencias fueron obtenidas de Gorziglia y col 1986b.

(*)Virulecía (-), indica que el virus fué aislado de pacientes asintomáticos y (+), de sintomáticos.

la proteína completa, es muy baja para inducir anticuerpos per se, pero no para inducir células de memoria y al momento de recibir una mayor cantidad de la conformación adecuada en la proteína nativa se activan las células de memoria, induciendo una respuesta de tipo secundaria en contra del epítipo.

La habilidad del péptido VP4-1 para sensibilizar la respuesta inmune hacia un estímulo secundario puede representar una nueva estrategia de vacunación, así como una herramienta para estudiar los mecanismos involucrados en la respuesta inmune. El aumento de anticuerpos en la respuesta a la inmunización con el virus completo, también pudo detectarse por ensayos de ELISA para determinar anticuerpos anti-péptido y anti-virus (fig 1-B y 1C del artículo), lo cual sugiere que el aumento en la respuesta inmune detectado en el sistema de neutralización pudiera deberse, al menos en parte a anticuerpos dirigidos contra la región representada por el péptido VP4-1.

Para el péptido VP4-2,, no se detectó ninguna variación con respecto a los grupos controles en todos los métodos de detección de anticuerpos. Estos resultados sugieren que esta región representada por VP4-2, no juega ninguna función importante en la inducción de anticuerpos neutralizantes, lo cual concuerda con el análisis de mutantes resistentes a ser neutralizadas, ninguno de los cuales ha sido mapeado en esta región (Mackow, R. D., y col 1988b; Taniguchi, K., y col 1988b; taniguchi, K., y col 1987; Nishikawa, K., y col 1989).

Aunque sabemos que cambios en los amino ácidos 211 y 223 de la proteína VP7 generan mutantes que son resistentes a la neutralización de los anticuerpos monoclonales que se usan para seleccionarlás, el péptido VP7-1 (del amino ácido 211 al 223), que contiene ambos amino ácidos, no indujo anticuerpos neutralizantes ni fue capaz de sensibilizar al sistema inmune de ratones a la administración posterior del virus completo. Estos resultados sugieren, de acuerdo con observaciones previas (Dyall -Smith, M. L., y col 1986), que el epítipo contenido en esta región de la proteína es conformacional.

Para analizar si el aumento en la respuesta de anticuerpos, al administrarse el rotavirus SA11 al grupo de ratones previamente inmunizado con el péptido VP4-1 estaba dirigido principalmente contra epítipos presentes en el péptido, o contra otros epítipos de VP4 o aún de VP7, los sueros se adsorbieron con el péptido VP4-1. Posteriormente, en los sueros adsorbidos se determinó la presencia de anticuerpos tanto contra el mismo péptido VP4-1 como contra el virus SA11, por el método de ELISA. En este experimento se observó una disminución de aproximadamente 90% y 50% de anticuerpos anti-péptido y anti-irus respectivamente (fig 2D).

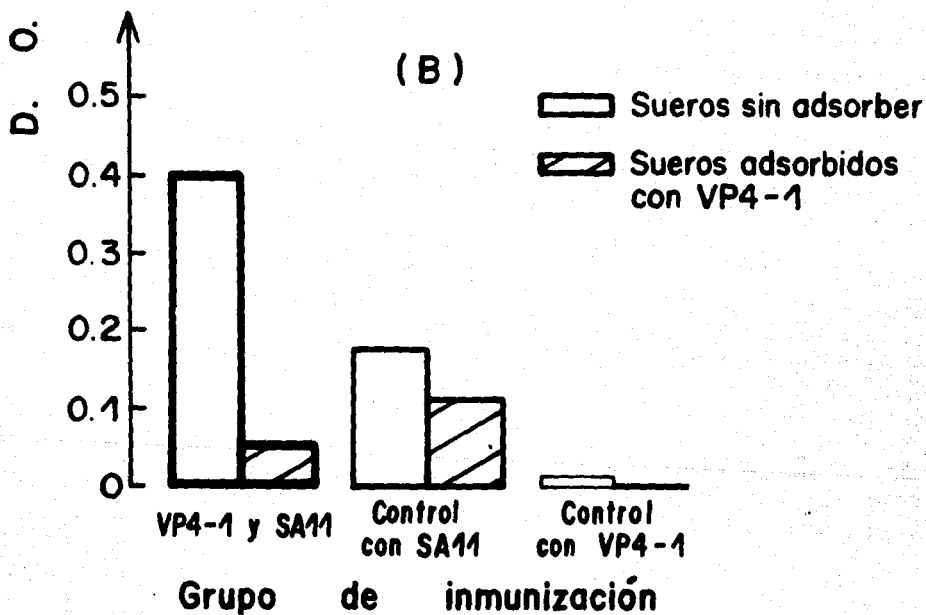
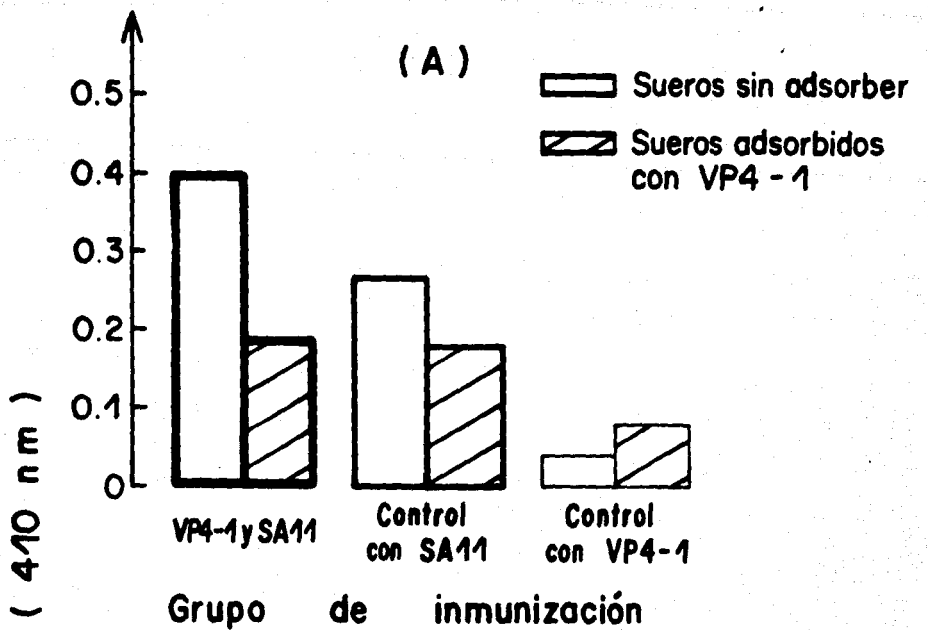


Figura 2D. Disminución del título de anticuerpos por ELISA contra SA11 (A) y contra el péptido VP4 1 (B) en el suero de ratones inmunizados con el péptido VP4-1; se corrieron sueros de animales que solo recibieron CA11 o solo VP4-1.

Estos resultados, aunque muy preliminares, sugieren que el aumento en la respuesta fue predominantemente dirigido hacia epítomos presentes en el péptido VP4-1. Esto no descarta la posibilidad de que el péptido VP4-1 pudiera haber inducido una respuesta de tipo secundaria contra epítomos presentes en otras regiones de la proteína o aún en otras proteínas del virus, ya que se ha reportado en el virus de la hepatitis B, que un péptido derivado de la proteína que forma el "core" del virus es capaz de sensibilizar el sistema inmune contra distintas regiones de la misma proteína, pero también contra epítomos presentes en el antígeno de superficie del virus (Millich, D. R., y col 1987). El mecanismo responsable de esta cooperación intermolecular se piensa que sigue la siguiente serie de eventos: a) Una célula B, específica para el antígeno de superficie internaliza una partícula viral; b) ésta célula B expone en su superficie fragmentos de la proteína del core, asociados a las proteínas de los antígenos de histocompatibilidad clase II, los cuales son reconocidos por células T ayudadoras específicas de la proteína del "core"; y c) se secretan linfocinas localmente, y éstas sustancias estimulan a dividirse a las células B, específicas de las proteínas de superficie, resultando en la secreción de más anticuerpos específicos del antígeno de superficie.

Por otro lado, los resultados negativos de sensibilización con los péptidos VP4-2 y VP7-1, indican que el efecto observado con el péptido VP4-1 fue específico y no debido a un efecto de adyuvante como se ha descrito para algunos péptidos sintéticos (Arnon, R., y col 1980; Chedid, L., y col 1976).

Debido a que el péptido VP4-1 representa una región de la proteína VP4 que está muy conservada entre proteínas homólogas de diferentes serotipos (Taniguchi, K., y col 1988b; Mackow, R. E., y col 1988; Gorziglia, M., y col 1986b), se probó su capacidad para sensibilizar la respuesta inmune hacia rotavirus pertenecientes a los serotipos 1 (rotavirus Wa), 2 (rotavirus S2), y 4 (rotavirus ST3). Aunque los anticuerpos inducidos en respuesta a la inmunización con SA11, de animales previamente inoculados con el péptido VP4-1, no neutralizaran a virus de otros serotipos (con excepción de ST3, que es neutralizado a bajos títulos ver Tabla 1 del artículo), cabía la posibilidad de que al inmunizar otros serotipos de rotavirus a los animales sensibilizados con VP4-1, de la proteína VP4, pudiera ser reconocida por las células de memoria inducidas previamente por el péptido. Los resultados (fig 1C) mostraron que en el caso del grupo que recibió el péptido VP4-1 seguido de una dosis del rotavirus ST3, perteneciente al serotipo 4, pero que sin embargo, éste epítome se encuentra en una conformación ligeramente diferente en cada uno de los virus, y que ambas conformaciones, presentes en la población de péptidos, indujeron células de memoria. Al analizar las diferencias de amino ácidos en la región correspondiente a el péptido VP4-1 (219-234; en el artículo aparece como 220-233, debido a que en el análisis de amino ácidos no apareció la valina con la cual se inició la síntesis del péptido ni la tirosina que fué pegada al

final de la síntesis química, por lo cual no se tomaron en consideración en la publicación) de la proteína VP4 de las cepas de rotavirus SA11 y ST3 (fig 1D), observamos que el SA11 es más parecido a Wa y SD1 (del mismo serotipo que S2) que a ST3. Esto sugiere que la región conservada entre SA11 y ST3 (del amino ácido 228-234) pudiera ser la responsable de la capacidad del péptido VP4-1 para sensibilizar la respuesta inmune hacia ambos virus. Aunado a estos resultados, se reportó recientemente que un péptido de VP4 del rotavirus de SA11 (del amino ácido 228-241), que representa la región carboxilo terminal generada por el corte con tripsina (Streckert, H. J., y col 1988), indujo anticuerpos neutralizantes contra SA11, pero falló en neutralizar a otros serotipos probados (Wa, S2, NCDV y UK). Ya que existe sobrelapamiento (de los amino ácidos 228-234) entre el péptido sintetizado por Streckert, y el péptido VP4-1 analizado en este trabajo, esto sugiere que la región de sobrelapamiento puede ser la responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes.

Los sitios de la proteína VP4 de rotavirus involucrados en la inducción de anticuerpos neutralizantes, han sido localizados a través del análisis de las secuencias de amino ácidos deducida de las secuencias de nucleótidos del gen 4 (que codifica por VP4), de mutantes que escapan a la neutralización por anticuerpos monoclonales neutralizantes específicos de VP4. Estos sitios han sido localizados en tres y seis diferentes regiones de VP4, en rotavirus de humano y de simio, respectivamente (Mackow, R. M., y col 1988; Taniguchi, K., y col 1988; Greenberg, H., y col 1983; Gorziglia, M., y col 1986b). Los tres dominios de neutralización identificados en el rotavirus de humano fueron mapeados en VP5, mientras que cinco de los seis dominios de neutralización del rotavirus de simio fueron mapeados en VP8, el producto amino terminal del rompimiento con tripsina de VP4. Es interesante que ninguno de los mutantes de escape fue mapeado en o cerca de los sitios de corte de tripsina, incluyendo las regiones que representan a los péptidos VP4-1 y VP4-2. Estos resultados sugieren que los epítopos de neutralización en la región de corte con tripsina, como fue reportado por Streckert, H., y col (1988), son menos inmunopotentes que otras regiones de VP4. Esto es consistente con el hecho de que un suero hiperinmune contra la partícula viral completa de SA11 no reconoció al péptido en un ensayo de ELISA, aunque esto último también pudiera deberse a que la conformación del péptido, similar a la que esta presente en la proteína nativa, es muy baja. Por otro lado, la alta conservación de la secuencia representada por el péptido VP4-1 podría indicar la necesidad de mantenerla sin alteraciones para conservar la infectividad viral, probablemente por estar involucrada en la penetración del virus a su célula huésped.

El hecho de que la inoculación del virus SA11 a animales sensibilizados con el péptido VP4-1 causara un incremento en el título de anticuerpos anti-péptido (medido por ELISA) es sugerente que el péptido VP4-1 comparte al menos un epítipo de célula B con la proteína VP4, tal y como se encuentra en el virus. Además, la observación de que el péptido fué capaz de sensibilizar a los

animales para una respuesta de anticuerpos neutralizantes, en ausencia de una proteína acarreadora, indica que este péptido puede iniciar su propia respuesta de células ayudadoras, lo cual sugiere que contiene, además de un epítipo B, un epítipo de células T.

Varios investigadores han descrito un efecto de sensibilización mediado por un epítipo de células T, presente en la misma proteína u otra proteína del mismo microorganismo. Por lo tanto, el mecanismo a través del cual el péptido VP4-1 es capaz de sensibilizar el sistema inmune para una respuesta de anticuerpos neutralizantes hacia los rotavirus SA11 y ST3 queda aún como una pregunta abierta y se deberán efectuar experimentos para poder responsabilizar de este efecto de sensibilización a un epítipo de células B o de células T.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA.

Arias, C. F., Lizano, M., and Lopez, S. 1987. Synthesis in Escherichia coli and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage sites associated with trypsin enhancement of a rotavirus SA11 infectivity. J. Gen. Virol. 68: 633-642.

Arias, C. F. Ballado, T., and Plebański, M. 1986. Synthesis of a major bovine rotavirus neutralization antigen VP7c in Escherichia coli. Gene 47:211-219

Arias, C. F., Lopez S., Bell, J. R., and Strauss, J. H. 1984. Primary structure of the neutralization antigen of simian rotavirus SA11 as deduced from cDNA sequence. J. of Virol 50: 657-661.

Arias, C. F., Lopez S., and Espejo, R. T. 1982. Gene protein products of SA11 simian rotavirus genome. J. Virol. 41: 42-50.

Arnon, R., Sela, M., Parant, M., and Chedid, L. 1980. Antiviral response elicited by a completely synthetic antigen with built in adjuvanticity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 6769-6772.

Bishop, R. F., Davidson, C. P., Holmes, I H., and Rock, B. J. 1973. Virus particles in epithelial cell of duodenal mucosa from children with acute non bacterial gastroenteritis. Lancet 11:1281-1285.

Bohl, E. H. 1979. Rotaviral diarrheain pigs: Brief review. J. Am. Vet. Med. Assoc. 174:613.

Both, G. W., Mattick, J. S., and Bellamy, A. R. 1983. The serotype-specific glycoprotein of simian-11 rotavirus: coding assignment and gene sequence. Proceeding of the Nat. acad. of Sci. USA. 80: 3091-3095.

Bryden, A. S., Thoules, M. D., and Flewett, T. H. 1976. Rotavirus in rabbit. Vet. Rec. 99:232.

Burns, J. W., Greenberg, H. B., Shaw, R. D., and Estes, M. K. 1988. Functional and Topographical analysis of epitopes on the hemagglutinin (VP4) of the simian rotavirus SA11. *J. of Viral* 62:2164-2172.

Caust, J., Dyall-Smith, M. L., Lazdins, I., and Holmes, I. H. 1987. Glycosylation and important modifier of rotavirus antigenicity. *Arch Virol.* 96:123-134.

Clark, S. S., Roth, J. R., Clark, M. L., Barnett, B., and Pendlove, R, S. 1981. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: Mechanism of enhancement. *J. of Virol* 39:816.

Clark, J. D., Hill, S. M., and Phillips, P. H. 1988. Investigation of hospital acquired rotavirus gastroenteritis using RNA electrophoresis. *J. of Medical Virol.* 26:289-299.

Cukor, G., and Blacklow, N. R. 1984. Human viral gastroenteritis. *Microbiol. Rev.* 48:157-179.

Champsaur H., Questiaux E., Prevot J., Amar M. H., Gldszmidt D., Bourjouane M. and Bach C. 1984. Rotavirus carriage asymptomatic infection disease in the first two years of life i virus sheadding. *J. Infect. Dis.* 149(5): 667-674.

Chedid, L., Audibert, F., Lefrancier., Choay, J., and Lederer, E. 1976. Modulation of the immune response by a synthetic adjuvant and analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73(7): 2472-2475..

Chiba, S. Y., Nakata, S. M., Urasawa, T., Taniguchi, K., Urasawa, S., and Nakao, T. 1986. Protective effect of naturally acquired homotypic and heterotypic rotavirus antibodies. *Lancet* 2, 417-421.

Davidson, G. P., and Barnes, G. L. 1979. Structural and funtional abnormalities of the small intestine in infants and young children whit rotavirus enteritis. Citado por Holmes I 1983.

Dyall-Smith, M. L., Lazdins, I., Tregar, G. W., and Holmes, I. A. 1986. Localization of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:3465-3468.

Emini E. A., Jameson B. A., and Wimmer E. 1983. Priming and induction of anti-poliovirus neutralizing antibodies by synthetic peptides. *Nature* 304: 669- 703.

Emini E. A., Berger J., Hughes J. V., Mitra S. W., and Linemeyer D. L. 1985. Priming of an anti-hepatitis -A virus antibodies response by poliovirus-specific synthetic peptides. Localization of potential antigenic sites of hepatitis-A virus neutralization. In: *Molecular and Chemical Basis of Resistance to Parasitic Bacterial and Viral Disease*. Vaccine 85. editors: Lerner A. R., Chanock R. M., Brown F. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 217-220.

Espejo, R. T., Calderon, E., Gonzales, N., Salomon, A., Martuchelli., and Romero, P. 1979. Presence of two distinct types of rotavirus in infants and Young children hospitalized with acute gastroenteritis in Mexico City 1977. *J. Infect. Dis.* 139:474-477.

Espejo, R. T., Lopez S. and Arias C. F. 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and The effect of trypsin. *J. Virol.* 37: 157-160.

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

Estes, M. K., Palmer, E. L., and Obijeski, J. F. 1983. Rotavirns a review. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 105:123-184.

Etlinger, H. M., Heimer, E. P., Trzeciak, A., Felix, A. M., and Gillessen, D. 1988a. Assessment in mice of a synthetic peptide-based vaccine against the sporozoite stage of the human malaria parasite *P. falciparum*. *Immunology* 64: 551-558.

Etlinger, H. M., Felix, A. M., Gillessen, D., Heimer, E. P., Just, M., Pink, R. L., Singaglia, F., Sturcheler, D., Takacs, B., Trzeciak, A., and Matile, H. 1988b. Assessment in human a synthetic peptide-based vaccine against the sporozoite stage of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Immunology* 140(2): 626-633.

Flores, J., Midthum, K., Hoshino, K., Green, K.,

Gorziglia, M., Kapikian, A. Z., and Chanock, R. M. 1986. Conservation of the fourth gene among rotavirus recovered from asymptomatic newborn infants and its possible role in attenuation. *J. Virol.* 60: 972-979.

Francis M. S., Fry C. M., Rowlands D. J., Brown F., Bittlee J. L., Houghten R. A., and Lerner R. A. 1985. Priming with peptides of Foot-and-Moouth Disease virus. In: *Molecular and Chemical Basis of Resistance to Parasitic Bacterial and Viral Disease. Vaccines 85.* Lerner A. R., Chanock R. M., Brown F. editors. Cold Spring Harbor Laboratories. New York. 217-220.

Francis, M. S., Fry, C. M., Rowlands, D. J., Brown, F., Bittlee, J. L., Houghten, R. A., and Lerner, R. A., 1985. Immunological priming with synthetic peptides os Foot-and Moouth disease virus. *J. Gen. Virol* 66: 2347-2354.

Fukura, N., Yoshie, O., Kitaoka, S., and Konno, T. 1988. Role of VP3 in human rotavirus internalization after target cell attachment via VP7. *J. of Virol.* 62:2209-2218.

Green, K. Y., Hoshino, Y., and Ikegami, N. 1989. sequence analysis of the gene encoding the serotype-specific glycoprotein (VP7) of the two new human serotypes. *Virology.* 168:429-433.

Greenberg, H. B., Valdesuso, J., Van Wyke, K., Mithum, K., Walsh, M., McAuliffe, V., Wyatt, A. R., Kalika, A. R., Flores, J., and Hoshino, Y. 1983. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J. Virol.* 47: 267-275.

Greenberg, H. B., McAulliffe, V., Valdesuso, J., Wyatt, R., Flores, J., Kalika, A., Hoshino, Y., and Singh, N. 1983b. serological analysis of the subgroup protein of rotavirus using monoclonal antibodies. *Infect Immunology* 39:91-99.

Gorziglia, M., Aguirre I., Hoshino I., Esparza J., Blumentals I., Glass R. I., Kapikian A. Z., and Chanock r. 1986. VP7 serotype-specific glycoprotein of OSU porcine rotavirus: coding assignment and gene secuence. *J. Gen. Virol.* 67: 2445-2454.

Gorziglia, M., Hoshino Y., Buckler-White A., Blumentals I., Glass R., Flores J., Kapikian A., and Chanock R. M. 1986b. Conservation of aminoacid sequence of VP8 and cleavage region of

84 Kda outer capsid protein among rotavirus recovered from asymptomatic neonatal infection Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 7039-7043.

Corziglia, M., Green, K., Nishikawa, K., Taniguchi, K., Jones, R., Kapikian, A. Z., and Chanock, R. M. 1988. Sequence of the fourth gene of human rotaviruses recovered from asymptomatic infections. J. of Virology 62(8): 2978-2984.

Gunn, P. R., Sato, F., Powell, K. H., Bellamy, R. A., Napier, J. R., Harding, D. K., Hanock, W. S., Tlegman, L. S., and Both, G. 1985. Rotavirus neutralizing protein VP7 antigenic determinants investigated by sequence analysis and peptide synthesis. J. of Virol. 54: 791-797.

Helmberg-Jones, M., and Patton, J. T. 1986. Characterization of subviral particles in cell infected with simian rotavirus SA11. Virology 155:554-665.

Herrington, D. A., Clyde, D. F., Losonsky, G., Cortesia, M., Murphy, J. R., Davis, J., Baqar, S., Felix, A. M., Heimer, E. P., Gillessen, D., Nardin, E., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V., Hollingdale, M. R., and Levin, M. M. 1987. Safety and immunogenicity in man of synthetic peptide malaria vaccine against Plasmodium falciparum sporozoites. Nature. 328: 257-259.

Holmes, I. H. 1983. Rotaviruses In: The Reoviridae W. K. Jokik, edit. Plenum Publishing Corporation.

Hoshino, Y., Sereno, M. M., Midthun, K., Flores, J., Kapikian, A. Z., and Chanok, R. M. 1985. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 8701-8704.

Jacob, C. H. O., Grossleld, S., Sela, M., and Arnon, R. 1986. Priming immune response to cholera toxin induced by synthetic peptides. Eur. J. Immunol. 16: 1057-1062.

Kalica, A. R., Greenber, H.B., Wyat, R. G., Flores, J., Sereno, M. M., Kapikian, A. Z., and Chanok, R. M. 1981. Genes of human (strain Wa) and bovine (strain UK) rotaviruses that code for neutralization and subgroup antigens. Virology 112, 385.

Kaljot, K. T., Shaw, R. D., Rubin, D. H., and Greenberg, H. B. 1988. Infectious rotavirus enter cells by direct cell

membrane penetration, not by endocytosis. J. Virol. 62(4):1136-1144.

Kapikian, A. Z., Wyatt R. G., Greenberg H. B., Kalica A. R., Kim H. W., Brandt C. D., Roriguez W. J., Rarrott R. H., and Chanock R. M. 1980. Approaches to immunization of infant and young children against gastroenteritis due to rotavirus. Rev. Infect. Dis. 2

Kapikian, A. Z., Cline, W. L., Greenberg, H. B., Wyatt, R. G., Kalika, A. R., Banks, C. E., James, H. D., Flores, J., and Chanock, R. M. 1981. Antigenic characterization assay (IAHA): Evidence for distinctness of IAHA and neutralization antigens. Infect. Immun. 33:415-425.

Kapikian, A. Z., and Chanock, R. M. 1985. Rotavirus. In virology (Fields, B. N. et al Eds.) pp 863-906 Raven Press New York.

Krausslich, H. G., Ingraham, R. H., Skoog, M. T., Wimmer, E., Pallait, P. V., and Carter, C. A. 1989. Activity of purified biosynthetic proteinase of human immunodeficiency virus on natural substrates and synthetic peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:807-811.

Kurt-Jones, E. A., Liano, D., Hay-Glass. K. A., Benacerraf, B., Sy Man-Sun., and Abbas, A. K. 1988. The role of antigen presenting B cells in T cells priming "in vivo": Studies of B cell-deficient mice. J. Immunol.140(11): 3773-37

Liu M., Offit P. A., and Estes M. K. 1988. Identification of the simian rotavirus SA11 genome segment 3 product. Virol 163: 26-32.

López S., Arias C. F., Bell J. R., Strauss J. H., and Espejo R. T. 1985. Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. Virol. 144: 11-19.

López, S. 1986. Caracterización Molecular de la proteína responsable del incremento de la infectividad causado por tripsina en el rotavirus de simio SA11. Tesis de doctorado en Investigación Biomédica Básica de la UACYP del CCH de la UNAM.

Mackow, R. E., Shaw, R. D., Matzui, M. S., Vo, T. P., Dang, M., and Greenberg, H. B. 1987. Characterization of the Rhesus rotavirus VP3 gene: Location of amino acid involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 16: 26-29.

Mackow, R. E., Shaw, R. D., Matzui, M. S., Vo, T. P., Dang, M., and Greenberg, H. B. 1988. The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: Location of amino acid involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 645-649.

Mackow, R. E., Shaw, R.D., Matsui, M. S., Vo, P. T., Benfield, D. A., and Greenberg, H. B. 1988b. Characterization of homotypic and heterotypic VP7 neutralization sites of Rhesus rotavirus. Virology 165: 511-517

Mason, B. B., Graham, D. Y., Estes, K. M. 1980. In vitro transcription and translation of simian rotavirus SA11 gene products. J. of Virol. 33:1111-1121.

Mason, B. B., Graham D. Y., and Estes M. K. 1983 Biochemical mapping of the simian rotavirus SA11 genome. J. Virol. 46: 413- 423.

Mc Crae, M. A., and Mc Corquodale, J. G. 1987. Expression of a major bovine rotavirus neutralization antigen VP7c in Escherichia coli. Gene 55:9-18.

Mc Lean, and Holmes, I. H. 1981. Effects of antibodies trypsin and trypsin inhibitors on susceptibility of neonates to rotavirus infection. J. Clin. Microbiol. 13:22-29.

Mc Nulty, M. S., Pearson G. R., Mc Ferran J. B., Collins D. S., and Allan G. M. 1976. A reovirus like agent (rotavirus) associated with diarrhea in neonatal pigs. Vet. Microbiol. 1: 55-63.

Mebus, C. A., Underdahl, N. R., Rhodes, M. B., and Twrehaus, M. J. 1969. Calf diarrhea(Scours): Reproduced with a virus from a field outbreak Univ Nebraska Agric. Exp. Station. Nes Bull 233:1.

Mebus, C. A., Kno M., Underdahl N. R., and Twiehans M. S. 1971. Cell culture propagation of neonatal calf diarrhea (scours) virus. *Can. Vet. J.* 12: 69-72.

Mebus, C. A., Wyatt, R. G., and Kapikian, A. Z. 1977. Pathology of diarrhea in gnotobiotic calves induced by the human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Vet. Pathol.* 14: 473-282.

Milich, D. R., Mc. Lachlan A., Thorton G. B., and Hugles J. L. 1987. Antibody production to nucleic capsid and envelop of the hepatitis-B virus primed by a single synthetic T cell site. *Nature* 32: 547- 549.

Much, D., and Zajac, I. 1972. Purification and characterization of epizootic diarrhea of infant mice virus. *Infect. Immun.* 6:1019-1024.

Nishikawa, K., Hoshino, Y., Tanigushi, K., Green, K. Y., Greenberg, H. B., Kapikian, A. Z., Chanok, R. M., and Gorziglia M. 1989. Rotavirus VP7 neutralization epitopes of serotype 3 strains. *Virology* 171: 503-515.

Offit, P. A., Shaw R. D., and Greenberg H. B. 1986. Passive protection against rotavirus induced diarrhea by monoclonal antibodies to surface proteins VP3 and VP7. *J. Virol.* 58: 6670-6674.

Offit, P. A., Clark, H. F., Blavat, G., and Greenberg, H. B. 1986. Reassortant rotavirus containing structural proteins VP3 and VP7 from different parents induce antibodies protective against each parental serotype. *J. Virol.* 60: 491- 496.

Offit, P. A., Blavat, G., Greenberg, H. B., and CVlark, H. F. 1986. Molecular basis of rotavirus virulence: role of gene segment 4. *J. Virol.* 57: 46-49.

Organizacion Panamericana de la Salud. 1983. *Boletin Epidemiologico.* 4(2).

Parry, N. R., Syred, A., Rowlands, D. J., and Brown, F. 1988. A high proportion of anti-peptides antibodies recognize foot and mouth disease virus particles. *Immunology* 64:567-572.

Presentini, R., Perin, F., Ancilli, G., Nucci, D., Bartoloni, A., Rappuoli, R., and Antoni, G. 1989. Studies of the antigenic structure of two cross-reacting proteins, pertussis and Cholera toxins, using synthetic peptides. *Molecular Immunol.* 26(1):95-100.

Richardson, C. D., Sheid, A., and Choppin, P. W. 1980. Specific inhibition of paramixovirus and mixovirus replication by oligopeptides with amino acid sequence similar to those at the N-terminal of the F1 or HA2 viral polypeptides. *Virology* 105:205.

Richardson, M. A., Iwamoto A., Ikegami N., Namoto., and Furvichi Y. 1984. Nucleic Sequences of the gene encoding the serotype specific antigen of human (Wa) rotavirus comparison with the homologous gene from simian SA11 and UK bovine rotavirus. *J. Virol.* 51: 860- 862.

Rodriguez, W. J., Kim, H. W., Brant, M. K., Gardner, M. K., and Parrot, R. H. 1983. Use of electrophoresis of RNA from human rotavirusto establish the identity of strains involved in outbreaks in a tertiary care nursery. *J. Infect. Dis.* 148:34-40.

Sabara, M., Gilchrist, J. E., Hudson, G. R., and Babiuk, L. A. 1985. Preliminary characterization of an epitope involved in neutralization and cell of attachment that is located on the major bovine rotavirus glycoprotein. *J. Virol.* 53:58-66.

Schrier, R. D., Gnann, J. W., Landes, R., Lockshin, C., Richman, D., Mccutchan, A., Kennedy, C., Oldstone, M. B., and Nelson, J. A. 1989. T cell recognition of HIV synthetic peptide in a natural infection. *J. Immunology* 142(4): 1166-1176.

Shaw, D. R., Vo, P., Offit, P., Coulson, B. S., and Greenberg, H. B. 1986. Antigenic mapping of the surface proteins of rhesus rotavirus. *Virology* 155:434-451.

Shaw, D. R., Mackow, R. E., Dyall-Smith, M. L., Lazdins,

I., Holmes, H. I., and Greenberg, H. B. 1988. Serotypic Analysis of VP3 and VP7 Neutralization Escape Mutants of Rhesus Rotavirus. J. of Virology 62, 3509-3512.

Strecker, H-J., Brussow, H., and Werchow, H. 1988. A Synthetic Peptide Corresponding to the Region of VP3 from Rotavirus SA11 Induces Neutralizing Antibodies. J. of Virology 62(11):4265-4269.

Taniguchi, K., Morita, Y., Urasawa, T., and Urasawa, S. 1987. Cross-reactive neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus: Analysis with monoclonal antibodies and antigenic variants. J. Virol. 61: 1726-1730.

Taniguchi, K., Hoshino, Y., Nishikawa, K. Y., Green, W. L., Maloy, Y., Morita, S., Urasawa, S., Kapikian, A. Z., Chanock, R. M., and Gorziglia, M. 1988. Cross reactive and serotype specific neutralization epitope on VP7 of human rotavirus: Nucleotide sequence analysis of antigenic mutants selected with monoclonal antibodies. J. of Virology 62(6): 1870-1874.

Taniguchi, K., Maloy, W. L., Nishikawa, K., Green K. Y., Hoshino, Y., Urasawa, S., Kapikian, A. Z., Chanok, R. M., and Gorziglia, M. 1988b. Identification of cross reactive and serotype 2-specific neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus J of Virology 62(7): 2421-2426.

Thoules, M. E., 1979. Rotavirus polypeptides. J. Gen. Virol. 44::187.

Tzipori, S., Caple, I. W., and Butter, R. 1976. Isolation of a rotavirus from deer. Vet. Rec. 99:398.

Wyatt R. G., Greenberg H. B., James W. A., and Pettman A. Z. 1984. Definition of human rotavirus serotypes by plaque reduction assay. Infect. Immun. 37: 110-115.

Ward, R. L., Knowlton, D. R., Schiff, G. M., Hoshino, Y., and Greenberg, H. B. 1988. Relative concentration of serum neutralization antibodies to VP3 and VP7 proteins in adults infected with a human rotavirus. J. Virol. 62:1543-1549.