



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

03072



7
2ej

**FUSION DE UN EPITOPE DE NEUTRALIZACION DE ROTAVIRUS A LA
SUBUNIDAD B DE LA TOXINA DE COLERA**

**TESIS QUE PRESENTA EL BIOLOGO
RAMON GONZALEZ GARCIA-CONDE
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

**TESIS CON
FALSA DE ORIGEN**

1992



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.

INDICE

<u>INTRODUCCION</u>	1
Composición de los rotavirus	2
Proteínas Estructurales	3
Mapeo de epítopes neutralizantes en VP4	8
Desarrollo de vacunas	11
Inducción de anticuerpos neutralizantes contra rotavirus utilizando proteínas recombinantes	13
Proteínas de fusión	14
<u>OBJETIVO</u>	19

MATERIALES Y METODOS

	20
Construcción del plásmido pJS-Ro4	21
Secuencia del inserto de VP4 en pJS-Ro4	
Estabilidad del plásmido pJS-Ro4 en MC1061	
Ensayos de ELISA-GM1	22
Preparación de la proteína CTB-Ro4	23
Determinación de la concentración de la proteína CTB-Ro4 en sonicados totales de células	
Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	24
Inmunolectrotransferencia (Western blot)	
Ensayos de ELISA para detectar anticuerpos anti-péptido y anti-CTB	
Cepas de rotavirus	25
Ensayos de ELISA con virus ST-3 y Wa	
Ensayos para titulación de virus	26
Ensayos para neutralización de virus	
Inmunoprecipitación de VP4 con sueros anti-CTB-Ro4	27
Inmunización de ratones con la proteína CTB-Ro4	28

<u>RESULTADOS</u>	29
Construcción del gene híbrido ltb-Ro4-ctb	30
Antigenicidad de la proteína CTB-Ro4	33
Cuantificación de la proteína CTB-Ro4 sintetizada	39
Evaluación de la inmunogenicidad de CTB-Ro4	40
Reactividad de sueros con el péptido sintético Ro4 y con CTB	
Reactividad de sueros con rotavirus por ensayos de ELISA	42
Ensayos de neutralización	
Reactividad de sueros con VP4 soluble	45
<u>DISCUSION</u>	48
BIBLIOGRAFIA	57

INTRODUCCION

Los rotavirus fueron descubiertos por Bishop y colaboradores en 1973 (8). En la actualidad se sabe que los rotavirus son el agente etiológico de mayor importancia en las gastroenteritis de niños menores de dos años en todo el mundo (21,36), representando de 35 a 50% de los casos de hospitalización por diarrea en este grupo de edad (35). En países desarrollados la importancia de los rotavirus radica en un alta tasa de morbilidad (36,60), mientras que en países subdesarrollados, tanto la tasa de morbilidad como de mortalidad representan un problema serio de salud pública (26). Recientemente se determinó que anualmente se registran alrededor de 125 millones de casos de diarreas causadas por rotavirus en niños menores de cuatro años, con un saldo aproximado de 873,000 muertes (36).

COMPOSICION DE LOS ROTAVIRUS.

Los rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae*, su genoma está constituido por once segmentos de RNA de doble cadena (RNAdc) que van de 667 pares de bases (segmento 11) a 3302 pares de bases (segmento 1) (21). Cada segmento codifica para una proteína viral. El genoma está envuelto en una cápside formada por tres capas proteicas concéntricas e icosaédricas, teniendo la partícula

completa un diámetro aproximado de 70 nm, con una apariencia característica en la cual 60 peplómeros o "spikes" se proyectan desde la superficie del virión. Las proteínas VP1, VP2, y VP3 forman el "core" o núcleo del virión, dando VP2 la estructura a la capa más interna de proteínas; la capa intermedia está formada por la proteína VP6, mientras que la capa externa o de superficie del virus la constituyen las proteínas VP4 y VP7 (Fig. 1).

PROTEINAS ESTRUCTURALES

La proteína VP1, codificada por el segmento 1, forma parte del "core" del virión. El bajo porcentaje relativo de esta proteína en el virión (2%), sugiere que VP1 pudiera ser parte de un complejo enzimático. Se ha encontrado que VP1 tiene homología con RNA polimerasas de virus de RNA (21).

La proteína VP2, codificada en el segmento 2, es la tercera más abundante en el virión (15%). Se ha demostrado que esta proteína tiene la capacidad de unirse a ácidos nucleicos, especialmente a RNA de cadena sencilla (RNAs); esta unión no es secuencia específica. VP2 contiene "zippers" de leucina (secuencias de aminoácidos en las que se repiten leucinas de forma periódica, cada 7 aminoácidos aproximadamente), a partir de los aminoácidos 536 y 665; dicha distribución de leucinas pudiera estar involucrada en la

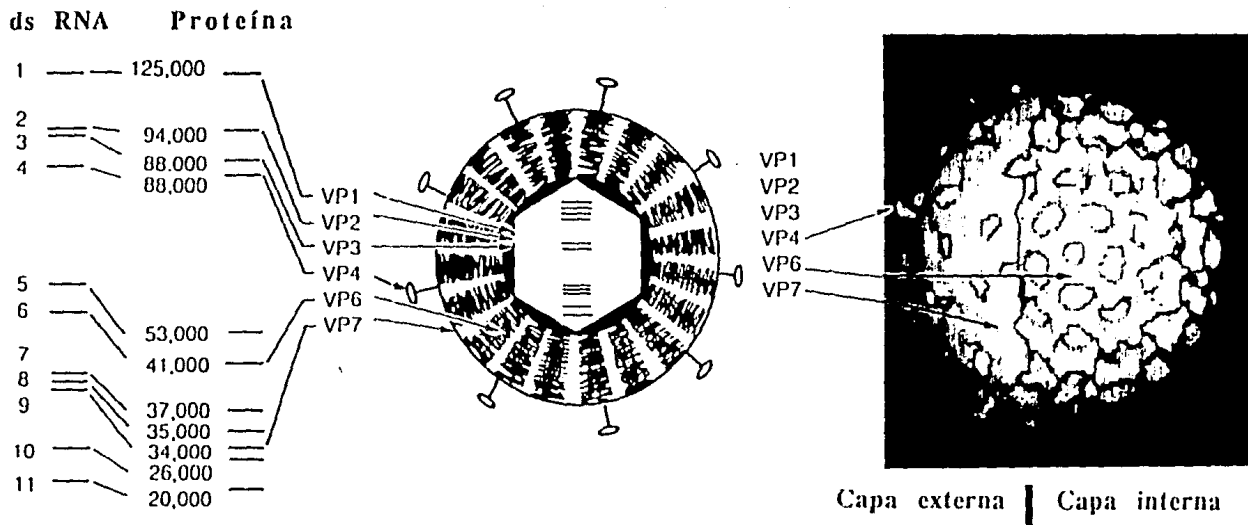


Fig. 1

Diagrama de Rotavirus, genoma y proteínas estructurales de cápside (VP6, VP4 y VP7).

interacción con RNA (21,37). Esto sugiere que VP2 puede tener una función importante en la unión, organización y/o ensamblaje de la núcleo-cápside. VP2 está miristilada, y aunque la función específica de esta modificación no se conoce aún, en otros sistemas virales ha sido demostrado que puede estar involucrada en "scaffolding", es decir en la organización conformacional de complejos protéicos, y por tanto en ensamblaje de partículas virales (21).

La proteína VP3, codificada en el segmento 3, constituye un porcentaje bajo de la proteína total del virión (0.5%). La función de esta proteína se desconoce; sin embargo, su secuencia de aminoácidos tiene homología con RNA polimerasas de otros virus, por lo que se piensa que pudiera estar involucrada en replicación del RNA (21).

La proteína VP6, codificada en el segmento 6, es la más abundante del virión (51%), y constituye la capa intermedia de proteínas. Se ha demostrado que esta proteína está presente en el virión en forma de trímeros (21). Estudios sobre la función de esta proteína sugieren que puede estar involucrada en transcripción (21,59). VP6 está miristilada, lo cual sugiere que puede estar involucrada en ensamblaje del virión o en la dirección del tráfico de gemación de las partículas virales en el retículo endoplásmico (21).

La proteína VP7, codificada en el segmento 7, 8 o 9, (dependiendo de la cepa viral) es la más abundante de la capa externa y la segunda más abundante del virión (30%). VP7 está glicosilada con residuos de alta manosa mediante un enlace N-glicosídico (21), y es un fuerte inmunógeno capaz de inducir anticuerpos neutralizantes contra el virus. Algunos estudios han sugerido que VP7 es la proteína responsable de la unión del virus a la célula huésped (7,27,54); sin embargo, la evidencia acumulada sugiere que es VP4 y no VP7 la proteína responsable de esta función (13,21).

VP7 presenta epítopes de neutralización tanto serotipo específicos como heterotípicos, los cuales mapean en dos regiones discretas de la proteína (32). VP7 es a la fecha la proteína mejor caracterizada inmunologicamente de los rotavirus, de ella depende la especificidad de los 14 serotipos determinados hasta ahora, siendo ésta una de las herramientas más importantes en estudios epidemiológicos sobre la infección por rotavirus.

VP4, la segunda proteína de capa externa, es codificada por el gene 4; tiene un peso molecular de aproximadamente 88,000 Da y consta de 775 aminoácidos en cepas humanas y 776 en cepas animales (29). VP4 es responsable de un número de funciones importantes para el virus: Es la hemaglutinina viral, y el dominio de hemaglutinación ha sido mapeado entre los aminoácidos 42 y 241 de la proteína (24,41,45); la proteína VP4 es además responsable del

aumento en la infectividad del virus cuando este es tratado con tripsina. Este procesamiento proteolítico ocurre entre los aminoácidos 241 y 242, y 247 y 248 (42,43), generando dos polipéptidos denominados VP8 (aa 1 a 241, PM 28,000 Da) y VP5 (aa 247 a 776, PM 60,000 Da). El corte con tripsina incrementa la penetración del virus a la célula huésped y por lo tanto la infectividad, pero no modifica la unión de la partícula viral a la superficie celular (15,27,34,50).

Estudios de criomicroscopía electrónica han mostrado que los "spikes" de rotavirus están formados por dímeros de VP4, los cuales tienen una apariencia de tallos delgados con una estructura globular terminal (68). El análisis de la estructura secundaria de VP4, indica que los 2/3 amino terminales de la proteína están formados mayoritariamente por regiones β plegadas, regiones con vueltas y enrollamiento al azar o "random coils", sugiriendo una conformación globular en esta región de la proteína (21,44), por otro lado, el tercio terminal de la región carboxilo de la proteína está formado principalmente por α -hélices, y se ha sugerido que esta región podría constituir el tallo de los "spikes" y estar involucrada en la dimerización de la proteína (44,68).

MAPEO DE EPITOPES NEUTRALIZANTES EN VP4

VP4, al igual que VP7, induce anticuerpos neutralizantes; anticuerpos monoclonales dirigidos contra esta proteína inhiben la infectividad del virus *in vitro* y son capaces de proteger pasivamente contra la diarrea causada por rotavirus (51).

Recientemente se han mapeado los sitios de interacción de anticuerpos monoclonales neutralizantes en VP4 (Fig. 2), a través de la secuenciación del gene 4 de mutantes que escapan a la neutralización por los diferentes mAbs. En VP8 de la cepa animal RRV, se han localizado cinco sitios involucrados en neutralización con reactividad tipo específica. Estos sitios están agrupados en una región hipervariable entre los aa 87 a 188 (10,46). Asimismo, se han descrito tres epítopes en VP5, alrededor de los aa 305, 392-439 y 433, los cuales están involucrados en la interacción con anticuerpos monoclonales neutralizantes que muestran reactividad cruzada entre cepas humanas de diferentes serotipos.

Las regiones que flanquean a los aminoácidos 392 y 439, así como la región alrededor del aa 433 en VP5, aparentemente representan epítopes "conformacionales", dependientes de un plegamiento específico de la proteína, ya que péptidos sintéticos correspondientes a estas regiones no son reconocidos por los mismos mAbs con los que estos epítopes fueron identificados (66).

El epítopo correspondiente a la región alrededor del aa 305, seleccionado con el monoclonal neutralizante YO-2C2 (66), tiene un

cambio en este aminoácido (305, de leucina a prolina). La región alrededor del aa 305 que comprende los residuos 296 a 313 está totalmente conservada en cepas sintomáticas de rotavirus (30,31) pertenecientes a los serotipos 1, 3 y 4. El mAb YO-2C2 neutraliza a virus humanos pertenecientes a estos tres serotipos (66,67), lo cual sugiere un papel importante de esta región en la neutralización del virus. Por otra parte, el mAb YO-2C2 reconoce en un ensayo de ELISA a un péptido sintético que comprende los aa 296 a 313 de VP4, lo que indica que este epítipo, a diferencia de los anteriores, es secuencial.

Los antecedentes muestran que tanto péptidos sintéticos que mimetizan secuencias de VP4 como regiones de esta proteína producidas en sistemas de expresión procariotes o eucariotes pueden inducir anticuerpos neutralizantes contra el virus. De esta manera, péptidos sintéticos con secuencias que mimetizan dos zonas conservadas entre los aa 220 a 233 y 228 a 241, y que se encuentran aledañas a los sitios de corte con tripsina en VP4 (aa 241 y 247) inducen anticuerpos neutralizantes contra el virus, aunque a nivel bajo (5). Del mismo modo, la región de VP4 que va de los aa 42 a 387 expresada en *E. coli*, así como VP8, o la proteína completa expresada en baculovirus, son capaces de inducir anticuerpos neutralizantes (4,22,52,64).

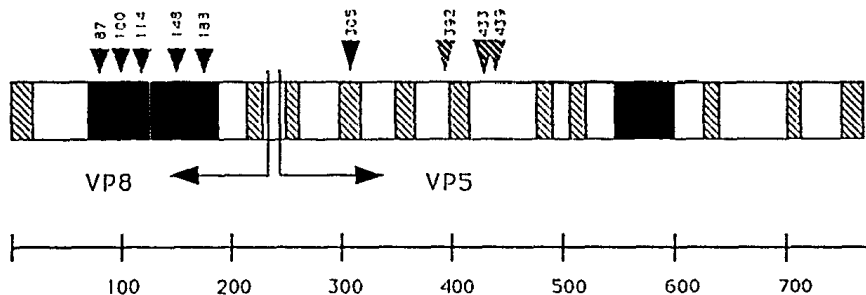


Fig. 2. Esquema diagramático de la proteína VP4. ▶ Indican los sitios involucrados en neutralización tipo específica en VP8. ▾ Indican los sitios involucrados en neutralización heterotípica en VP5. ▶ Indica la región en la que se localiza el epítipo neutralizante utilizado en este trabajo, correspondiente al péptido Ro4. Las barras punteadas representan las regiones hipervariables de la proteína, mientras que las barras rayadas representan las regiones más conservadas. └▶ indican los sitios de corte por tripsina que generan las proteínas VP8 y VP5.

DESARROLLO DE VACUNAS

Se sabe que la infección por rotavirus induce una respuesta inmune protectora; sin embargo, el mecanismo y duración de la inmunidad, así como las proteínas virales involucradas en ella están aún por ser identificadas con claridad (21,48). Como se ha mencionado, las proteínas VP4 y VP7 han sido identificadas como potenciales elementos importantes en la inducción de la respuesta inmune protectora.

La utilización de virus rearreglantes que tienen VP4 de una cepa y VP7 de otra cepa de diferente serotipo confiere en algunos casos protección pasiva contra el reto con cualquiera de las dos cepas parentales (48), i.e., la inmunidad conferida tiene características heterotípicas, lo cual no sucede utilizando las cepas parentales como inmunógenos. También se ha obtenido inmunidad pasiva contra la infección por rotavirus en ratones a los cuales se les ha administrando mAbs dirigidos contra VP4 o VP7 (48,51).

Dentro de los enfoques utilizados para el desarrollo de vacunas para humanos, está la utilización de cepas animales, obteniéndose resultados parcialmente satisfactorios. Los candidatos de mayor relevancia han sido: RIT 4237, una cepa bovina de serotipo 6, que mostró una eficiencia satisfactoria en las primeras pruebas en países desarrollados; sin embargo, fue ineficaz en pruebas hechas en países subdesarrollados (17,35,38,69). RRV MMU 18006 ha sido

también probada como vacuna; esta es una cepa de simio perteneciente al serotipo 3. Las pruebas realizadas con esta cepa permitieron determinar la necesidad de obtener protección heterotípica contra serotipos múltiples, ya que solo se obtuvo protección serotipo específica (1,25,35). El tercer candidato para vacuna es la cepa WC3, una cepa bovina de serotipo 6, que ha producido seroconversión homóloga, pero no seroconversión a los serotipos 1 y 3 (14,70).

Entre las alternativas de mayor relevancia, están las cepas rearreglantes, en las cuales se ha incorporado el gene de VP7 de cepas humanas de serotipos 1, 2 y 4 en un fondo genómico de la cepa animal de serotipo 3, RRV. Estas cepas han sido probadas tanto como vacuna monovalente, como tetravalente; las pruebas realizadas en países desarrollados y subdesarrollados, han mostrado que estas cepas son ligeramente reactogénicas (especialmente en países desarrollados), y que son inmunogénicas, siendo la respuesta inmune más baja en el caso de países subdesarrollados (35,70). Otra de las cepas rearreglantes que ha sido probada como vacuna, es la cepa WI79-9, esta cepa es un rearreglo de la cepa WC3 a la que se incorporó el gene de VP7 de una cepa humana de serotipo 1. Las pruebas realizadas en Estados Unidos con esta cepa, mostraron seroconversión tanto a WC3, como a serotipos 1 y 3 (70).

INDUCCION DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA ROTAVIRUS
UTILIZANDO PROTEINAS RECOMBINANTES

Una alternativa para el desarrollo de métodos de prevención de la infección por rotavirus, es el empleo de proteínas virales producidas utilizando métodos de DNA recombinante. La expresión de genes virales en sistemas procariontes y eucariontes ha permitido evaluar las propiedades inmunogénicas de algunas de las proteínas de rotavirus. Tanto VP7 como VP4 han sido expresadas solas o como proteínas de fusión en *E. coli* (3), obteniéndose en algunos casos inducción de anticuerpos neutralizantes con reactividad heterotípica, cuando se han inmunizado animales (32,54,61,65); sin embargo, los títulos de anticuerpos han mostrado ser inferiores a los títulos obtenidos cuando partículas virales completas son utilizadas como inmunógenos (2,4).

Sistemas de expresión eucariotes como baculovirus o vaccinia han sido también utilizados para síntesis de proteínas de rotavirus; la síntesis de proteínas virales en estos sistemas presenta la ventaja que es posible obtener proteínas que esten sujetas a modificaciones como glicosilación, miristilación, y procesamiento de señales, que reflejen las modificaciones que se llevan a cabo de manera natural en la molécula.

El panorama global relacionado a la utilización de proteínas recombinantes muestra que es posible obtener una respuesta de anticuerpos neutralizantes de naturaleza homotípica, y en algunos casos heterotípica, pero los niveles generados han sido comunmente bajos (2,21,22). Es entonces importante obtener condiciones en las que la respuesta inmune sea fuertemente estimulada, manteniendo la particularidad de generar anticuerpos contra las regiones de rotavirus que inducen anticuerpos neutralizantes heterotípicos.

PROTEINAS DE FUSION

Un número importante de proteínas bacterianas ha sido estudiado con el fin de obtener conocimientos detallados sobre sus propiedades estructurales y funcionales, así como su antigenicidad, inmunogenicidad y toxicidad en sistemas de expresión heterólogos (tabla I). Estos estudios han revelado algunas características que debe tener una proteína para ser usada como acarreadora de epítopes de interés: a) para inmunógenos entéricos, la proteína acarreadora debe ser capaz de estimular una respuesta inmune local secretoria e idealmente una respuesta celular; b) dado que entre los obstáculos para la expresión y síntesis de péptidos heterólogos está la sensibilidad a proteasas, la proteína acarreadora debe, en potencia, funcionar como vehículo estabilizante; c) la fusión de péptidos heterólogos debe llevarse a cabo en sitios que puedan

aceptar inserciones sin afectar la conformación o función de la molécula acarreadora, y sin comprometer su expresión o estabilidad. Sitios que muestran estas características han sido denominados "permisivos" (9); estos dominios son seleccionados, además, buscando que el péptido de fusión sea expuesto en la superficie de la molécula acarreadora.

Entre otras consideraciones importantes en la utilización de proteínas de fusión como inmunógenos está la vía de inmunización utilizada, ya que se ha demostrado que la misma proteína de fusión puede inducir diferentes niveles de anticuerpos, dependiendo de la vía de inmunización (12,39); por otro lado, la proteína acarreadora no debe de enmascarar la inmunogenicidad del péptido de fusión, sino potenciar la respuesta contra el mismo.

De manera general (como se resume en la tabla I), las proteínas utilizadas han mostrado proveer un alternativa promisoría para la producción de inmunógenos que puedan inducir inmunidad en el huésped. La fácil manipulación de bacterias recombinantes para la construcción de genes híbridos y la sobreproducción y purificación de antígeno, representa una alternativa menos costosa para la producción eventual de vacunas. Además el diseño de proteínas recombinantes no tóxicas presenta la ventaja, en potencia, de no tener efectos secundarios.

Una de las proteínas acarreadoras que cumple razonablemente con los requisitos antes mencionados es la subunidad B de la toxina de cólera.

La toxina de cólera es un polímero compuesto por dos subunidades (Fig. 3b); la subunidad A (CTA) funciona como una ADP-ribosiltransferasa, ADP-ribosilando un residuo de arginina del componente regulatorio G α del sistema de adenilato ciclasa; esto resulta en un incremento de cAMP y pérdida de iones y fluidos de la célula afectada (33,62). La subunidad B (CTB), por su parte, es un pentámero de 58,000 da. (11,600 da. por monómero), el cual tiene como función adherir a la holotoxina a la membrana celular a través de su receptor, el gangliósido GM1 (Fig. 3a). La síntesis de la subunidad B en bacterias recombinantes ha permitido el análisis de sus propiedades, independiente de CTA. CTB no pierde la capacidad para formar pentámeros en ausencia de CTA, manteniendo su habilidad para unirse a su receptor celular GM1 (33); además, CTB no tiene propiedades tóxicas (33). El análisis inmunológico de CTB ha mostrado que es un fuerte inmunógeno con capacidad de inducir una respuesta protectora en el huésped. El pentámero de CTB es una molécula muy estable resistente a desnaturalización hasta temperaturas de 74°C (28,62) y mantiene la capacidad de reasociación en pentámeros y asociación específica con el gangliósido GM1 (33). Las características del protómero B lo hacen atractivo para utilizarse como proteína acarreadora de péptidos de interés. Las propiedades de estabilidad, inmunogenicidad, y ausencia de toxicidad, y la unión de CTB con GM1, aumentan la capacidad de exponer de manera prolongada el epítipo de interés al sistema inmune local.

PROTEINA ACARREADORA	EPITOPE	INMUNOGENICIDAD	REFERENCIA
CTB/LTB	ST ¹ -Decapéptido	Induce anticuerpos vs. STa Híbrido reconocido por NmAb's ²	Sanchez et al. (68)
CTB/LTB	ST	Induce NAb's ³	Clements et al. (19)
CTB/LTB	S _{mutant}	Pruebas preliminares induce anticuerpos detectados en suero	Dertzbauch et al. (23)
LTA	ST	Inmunoreactividad con anti-STa y anti-LTA	Sanchez et al. (65)
Lamb	PreS2A, PreS2B de HBV ⁴	Inducen anti-epitope-específicos. Bajos NAb's	Charbit et al. (13a)
Lamb	C3 de Polio-virus	Induce anti-epitope-específicos. Bajos NAb's	Leclerc et al. (49)
Lamb	HTV 1	Induce anti-péptido-específicos	Charbit et al. (13a)
OmpC	ST	Induce anti-ST, anti-OmpC y	Saarilahti et al. (63)
MALE	C3 de Polio-virus	Induce anti-péptido, anti-virus. Bajos NAb's	Leclerc et al. (49)
Flagelina	CTB (CTP3 aa 50-64)	Induce anti-CTB y anti-flagelina	Newton et al. (59)
Flagelina	HBV proteína S de superficie (122-137)	Induce anti-S (122-137) y anti-proteína S	Newton et al. (59)
Flagelina	HBV PreS2 (120-145)	Induce anti-PreS2 (120-145) y anti-proteína S de HBV.	Newton et al. (59)
Proteína A	Neurotoxina (Eratobtoxina)	Induce anti-toxina y NAb's	Ducancel et al. (24)
Proteína A	Péptido de <i>P.falci-parum</i>	Induce anti-péptido, NAb's Inhibe reinvasión <i>in vitro</i>	Sjölander et al. (73)

¹ ST: Toxina termo-estable de *Escherichia coli*.

² NmAb's: Anticuerpos monoclonales neutralizantes.

³ NAb's: Anticuerpos neutralizantes.

⁴ HBV: Virus de la hepatitis B, (antígenos PreS2A y B).

Tabla I. Resumen de algunas de las proteínas de fusión realizadas a la fecha. Se indican tanto la proteína acarreadora como el epítotope de fusión, y los resultados generales obtenidos con cada una.

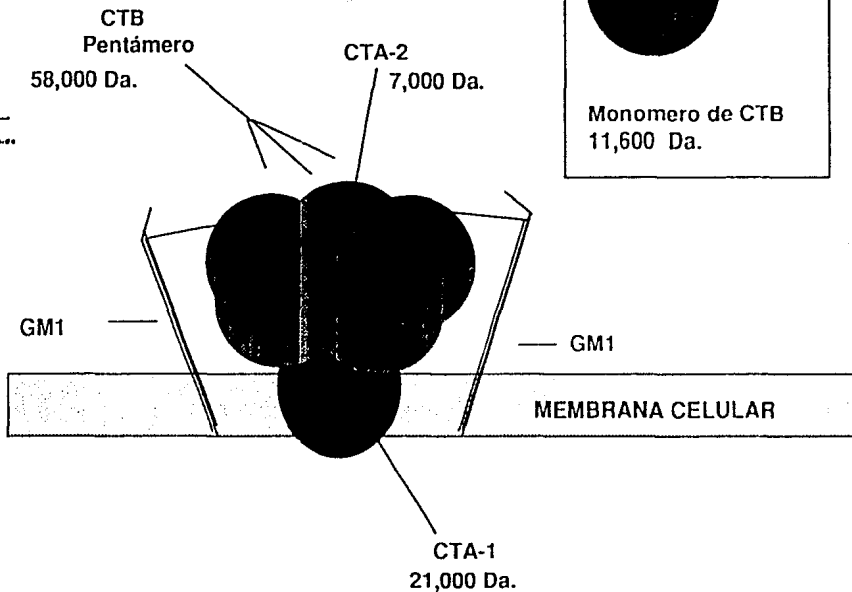
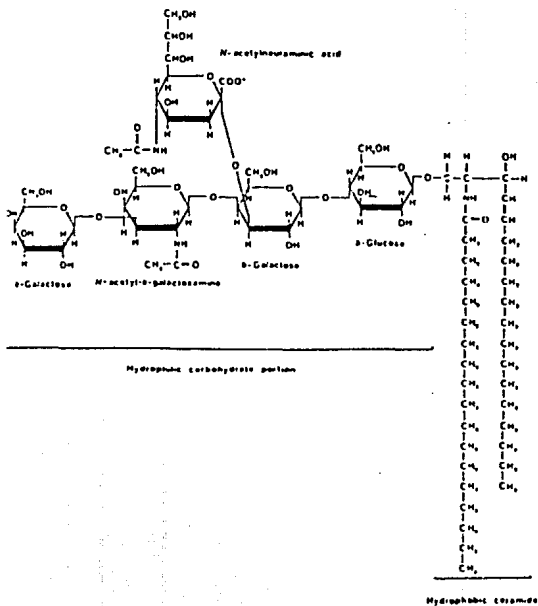


Fig. 3

Estructura de GM1, y modelo diagramático de CT.

OBJETIVO

Como se ha mencionado, la proteína de la cápside externa de rotavirus, VP4, juega un papel importante en la infección por rotavirus. La utilización de epítopes conservados de VP4 que han mostrado estar involucrados en interacción con anticuerpos neutralizantes, representa una alternativa promisoría para intentar inducir una respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes de naturaleza heterotípica.

El objetivo de este trabajo es construir un plásmido que dirija la síntesis de una proteína que tenga un epítotope de neutralización de VP4 fusionado al extremo amino terminal de CTB, y evaluar las propiedades antigénicas e inmunogénicas de esta proteína de fusión, incluida la inducción de anticuerpos neutralizantes contra rotavirus. El epítotope de VP4 que se planeó utilizar es el que comprende la región entre los aa 296 al 313 de la proteína, el cual es un epítotope lineal y está totalmente conservado entre virus pertenecientes a los serotipos 1, 3, y 4.

MATERIALES Y METODOS

Construcción del plásmido pJS-Ro4

El plásmido pJS752-3 (Fig. 4), derivado de pKK223-3, a su vez derivado de pBR322, contiene el gene híbrido que codifica para el péptido líder de LTB (subunidad B de la toxina termolabíl de *Escherichia coli*) unido al extremo 5' del gene que codifica para la proteína madura CTB. El gene híbrido ltb-ctb está bajo el control del promotor híbrido tac, utilizado para la sobreproducción de la proteína. El plásmido utiliza el origen de replicación de pBR322, y contiene el gene que confiere resistencia a ampicilina. El plásmido cuenta con varios sitios de corte para endonucleasas de restricción que pueden utilizarse para el diseño y construcción de genes híbridos de interés (55a).

Para la inserción de oligonucleótidos que codifican para el péptido Ro4 se utilizaron los sitios reconocidos por las enzimas SacI (GAGCT/C) y XmaI (GGGCC/C). Estos oligonucleótidos fueron diseñados para generar extremos cohesivos con terminación 5' AGCTG y 3' CCCGG al ser apareados (Fig. 5a). El plásmido pJS752-3 fue tratado con las endonucleasas SacI y XmaI y ligado a los oligonucleótidos apareados. El plásmido ligado (pJS-Ro4) fue tratado con la enzima SacI para reducir el fondo en la transformación, ya que el sitio de reconocimiento de esta enzima desaparece al insertarse los oligos de Ro4 en el plásmido pJS752-3, siendo remplazado por un sitio de restricción Sau3AI (cambiando de GAGCTC a GATC) en el plásmido pJS-Ro4.

La cepa de *Escherichia coli* MC1061 [gr D139, A(araleu) 7697, A lac X74, gal U, gal K', rK', mK', strA, recA'] fue transformada con el plásmido pJS-Ro4 (47). Las colonias transformadas fueron seleccionadas por resistencia a ampicilina y por hibridación en colonia con el oligonucleótido VP4/1, el cual se marcó radioactivamente en el extremo 5' con la enzima cinasa del fago T4 (47).

Secuencia del inserto de VP4 en pJS-Ro4

El análisis por restricción indicó la presencia de una sola copia de los oligonucleótidos en el plásmido construido. La secuencia de los oligonucleótidos insertados se confirmó por secuenciación directa del plásmido de doble cadena, con los oligonucleótidos VP4/1 (5'-3') y VP4/2 (3'-5'), por el método descrito en (47), utilizando el sistema "Sequenase" (Promega), como lo describe el fabricante.

Estabilidad del plásmido pJS-Ro4 en MC1061.

Cultivos de la cepa MC1061/pJS-Ro4 en medio líquido LB suplementado con ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ se crecieron a una $\text{OD}_{600\text{nm}}=1.00$, y fueron subsecuentemente diluidos de manera seriada y plateados sobre medio luria sólido con y sin ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$). Se determinó el porcentaje de colonias resistentes a ampicilina en relación al número de colonias totales (que crecen en ausencia de ampicilina). Tomando este cultivo como la generación 0 se inoculó medio líquido luria con ≈ 1000 bacterias de la generación 0, y se incubó hasta $\text{OD}_{600\text{nm}}=1.00$ (16 hr), se hicieron diluciones seriadas y se platearon sobre medio luria sólido con y sin ampicilina como se describió anteriormente, considerando ésta como la generación 20; los pasos anteriores fueron repetidos para obtener el porcentaje de bacterias resistentes a ampicilina en relación a las bacterias totales hasta la generación 40.

Ensayos de ELISA-GM1.

Las bacterias transformantes fueron analizadas por medio de ensayos de "ELISA-GM1", esencialmente como se describe en (57). Brevemente, placas de cloruro de polivinil (PVC, marca NUNC), para ensayo de ELISA, se sensibilizan con 1.5 μM de GM1 en PBS, incubando a temperatura ambiente (TA) toda la noche (12-14 hr). Posteriormente, las placas se lavan con PBS-Tween 20 0.05% (PBS-T 0.05%) tres veces, se bloquean con albumina de suero bovino (0.1%) en PBS durante 2 hr a 37°C y

finalmente se lavan 3 veces con PBS-T 0.05%. Sonificados de células (ver detalles más adelante) MC1061/pJS-Rc4, HB101/pJS752-3 o MC1061, en PBS, se añaden a la placa y ésta se incuba por 2 hr a 37°C. Posteriormente, se agrega el anticuerpo monoclonal (mAb) LT-39 (Mab que reconoce solo la forma pentamérica de CTB) o YO-2C2 (Mab contra el péptido Rc4 (66)), las placas se incuban por 2 hr a 37°C. Para detección se utiliza anti-IgG (αIgG) de ratón producidos en cabra, acoplados a la enzima peroxidasa (Amersham), incubando una dilución 1:2,500 del anticuerpo durante 2 hr a 37°C. Las placas se revelan con el sustrato hidrocloreuro de orto-fenilendiamina (OPD Sigma Inc.). Las lecturas de las placas se efectúan a una longitud de onda de 410 nm (450 nm después de inactivar a la enzima peroxidasa con H₂SO₄ 1N). Los valores obtenidos con una densidad óptica (OD_{410nm}) mayor de 0.20, habiendo restado los valores de fondo, son considerados positivos.

Preparación de la proteína CTB-Rc4

Las cepas MC1061/pJS-Rc4, HB101/pJS752-3, MC1061/pJS752-2, y MC1061, se cultivan en medio LB con ampicilina 100 µg/ml (la cepa control MC1061 fue cultivada en ausencia de ampicilina) hasta alcanzar una OD₆₀₀=1.00 (= 1 x 10⁸ bacterias/ml). Las células se cosechan por centrifugación a 11,500 g por 10' y se resuspenden en tris 0.2M, pH 8.0. Posteriormente, por cada litro de cultivo, se añaden 200 ml de una solución isosmótica de sacarosa 1M en tris 0.2M, 1 ml de EDTA 100 mM, conteniendo 6 µg/ml de lisozima, y 200 ml de H₂O. Se incuban las células en esta solución a temperatura ambiente por aproximadamente 20', colectando ≈ 20 µl cada 5' para visualizar la formación de esferoplastos en un microscopio de contraste de fase. Cuando la mayor parte de las células visibles bajo el microscopio han perdido la membrana celular (dando una apariencia esférica a las células), la solución se pone rápidamente en hielo y se adicionan 8 ml de MgCl₂ 1M en tris 0.2M para evitar la ruptura de los esferoplastos y la consecuente liberación de proteínas citoplásmicas. Los esferoplastos se sedimentan por centrifugación a 11,500 g por 10' y se recupera el sobrenadante que contiene la fracción de periplasma. Estas fracciones de periplasma fueron concentradas hasta tener una concentración de 750µg/ml de CTB o CTB-Rc4.

Determinación de la concentración de la proteína CTB-Ro4 en sonificados totales de células

Cultivos de cepas MC1061/pJS-Ro4, HE101/pJS752-2, MC1061/pJS752-3 y MC1061 en medio líquido luria, suplementado con ampicilina 100 µg/ml (excepto para cepa MC1061), se incuban a 37°C hasta alcanzar una $OD_{600nm}=1.00$. Las células se cosechan por centrifugación a 11.500 g por 10'. Se toma una alícuota del sobrenadante y la pastilla se resuspende en 1.5ml de PBS (concentrando el cultivo 167 veces). La pastilla se somete a 2 pulsos de 30'' de 10-14 µm de amplitud, en hielo, con un sonicador Soniprep 150 MSE. Los sonificados de células se ensayaron por ELISA-GM1 para determinar la concentración de la proteína CTB-Ro4. Se hicieron diluciones seriadas en PBS de cada preparación, así como diluciones de la proteína control CTB (Merieux). Las lecturas obtenidas por ELISA como se describió antes fueron utilizadas para determinar la concentración de la proteína en los sonificados celulares, en relación a la concentración de la proteína control.

Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).

Las preparaciones de periplasma con la proteína CTB-Ro4 se analizan utilizando geles de poliacrilamida con SDS, como se describe en (47), utilizando geles al 13.5%. Las muestras se tratan con buffer disruptor (SDS 1%, β-mercaptoetanol 1%, EDTA 2mM, glicerol 10%, tris.HCl 50mM pH 6.8); el monómero de la proteína se obtiene hirviendo las muestras por 2'. Las bandas de proteínas se tiñen con azul brillante de Coomassie.

Immunolectrotransferencia (Western blot).

Después de separar las proteínas por SDS-PAGE, las proteínas se transfieren a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell) en buffer de transferencia 25 mM tris.Cl, y 250mM glicina con metanol al 20%, con una corriente de 1 Amp por 2 hr a 4°C. Después de la transferencia, las membranas de nitrocelulosa se bloquean con albumina de suero bovino (BSA) 0.1% en PBS por 2 hr a temperatura ambiente (TA). Los Mab's LT-29 y YO-2C2 diluidos 1:100 y 1:500, respectivamente, en PBS-Tween 0.05%/BSA 0.1%, se añaden sobre las membranas y se incuban 2 hr a TA. Para la detección se empleó α IGG de ratón acoplado a peroxidasa, revelando con diaminobenzidina, o con Luminol (Amersham), como lo describe el fabricante. Entre cada paso se hicieron tres lavados con PBS-T 0.05% de 10'.

Ensayos de ELISA para detectar anticuerpos anti-péptido y anti-CTB

Estos ensayos fueron realizados esencialmente de la misma manera que los anteriores. Para detectar anticuerpos anti-péptido, 1 μ g o 5 μ g de péptido sintético Ro4 en PBS se añaden por cada pozo de placas de PVC Immunolon 2, y se incuban toda la noche (12-14 hr) a 37°C. Posteriormente, se agregan los sueros diluidos en serie, en PBS/BSA 0.1%, y se detectan con α IGG de ratón acoplado a peroxidasa, como se describe anteriormente.

Para detectar anticuerpos contra CTB, se empleó el ensayo de ELISA-GM1 descrito, empleando 0.035 μ g/pozo de CTB recombinante (Merieux, Francia).

Cepas de rotavirus

Los rotavirus ST3 (serotipo 4), Wa (serotipo 1), e Ito (serotipo 3) se propagaron en monocapas de células de epitelio de riñón de mono (MA104), en medio mínimo de Eagle (MEM, GIBCO) suplementado con suero bovino fetal (FCS) al 5%, como se describió anteriormente (6) y se purificaron por gradientes isopícnicos en CsCl de acuerdo al protocolo descrito (23).

Ensayos de ELISA con virus ST-3 y Wa.

Los virus purificados por gradientes de CsCl, o lisados de células infectadas con el virus correspondiente, se detectan de la siguiente manera. Como anticuerpo de captura se usa una mezcla de sueros hiperinmunes que contiene anticuerpos policlonales contra rotavirus de serotipos 1 a 4 (R₄R). Esta mezcla de sueros se diluye 1:2,500 en PBS, se añade a placas de ELISA (NUNC), y se incuba toda la noche a 37°C. Posteriormente se agrega el virus, ya sea purificado por CsCl o en lisado de células infectadas, se añaden y se incuban las placas por 2 hr a 37°C. Los sueros de ratones se añaden diluidos en serie en PBS/BSA 0.1% y se incuban por 2 hr a 37°C. Los anticuerpos se detectan con αIgG de ratón acoplado a peroxidasa como se describe anteriormente.

Ensayos para Titulación de Virus.

Una monocapa confluyente de células MA104 en placas C-96 (Costar) se lava 2X con PBS-C (conteniendo 1mM CaCl₂ y 10mM MgCl₂). Posteriormente, se agregan diluciones de los virus previamente activados con 10µg/ml de tripsina por 30' a 37°C, y se incuban 1 hr a 37°C para permitir la adsorción del virus a la célula. El inóculo se retira y se incuban las placas por 12 hr. Las células se fijan con acetona 80% en PBS por 30' a TA. Posteriormente, se añade un suero hiperinmune contra la cepa SA11 de rotavirus (C-127), a una dilución 1:2,500, y se incuba 2 hr a 37°C. Finalmente se añade una dilución 1:1,500 de proteína A (de *Staphylococcus aureus*) acoplada a peroxidasa (Amersham), y se incuba 2 hr a 37°C, revelando posteriormente con el substrato 3-amino-9-etilcarbazole, el cual al ser oxidado por la enzima peroxidasa se vuelve insoluble. Se determina el número de células teñidas (número de focos de peroxidasa) por la reacción en cada pozo de las placas C-96, obteniendo así el título de la preparación del virus que se está utilizando.

Ensayos para Neutralización de Virus.

Los ensayos de neutralización se efectúan esencialmente de la misma manera que lo descrito para titulación de virus. Una vez tratado el virus con tripsina, se mezcla la dilución preestablecida de éste (para que se obtengan 100 células infectadas) con diferentes diluciones en serie de los sueros a ensayar, en volúmenes iguales, y se incuba 1 hr a 37°C. Posteriormente, se añade la mezcla de suero con virus sobre células MA-104 que han sido lavadas previamente para eliminar el suero (FCS). Se incuban las placas 1 hr a 37°C, permitiendo la adsorción de los virus que no hayan sido bloqueados por anticuerpos; se retira el inóculo y se incuba 12 hr a 37°C. Las células se fijan y se tiñen como se describió antes. Se considera como el título de neutralización la dilución de los sueros en la que se reduce un 60% o más el número de focos de peroxidasa producidos por la infección, en relación al número de focos obtenidos en ausencia de suero. Los títulos fueron determinados restando los valores obtenidos con sueros preinmunes de cada ratón inmunizado, asimismo se consideró como fondo los valores obtenidos con los sueros de ratones inmunizados con la proteína control (CTB de periplasma de HE101/pJS7E2-3).

Inmunoprecipitación de VP4 con sueros anti-CTB-Rod

La proteína VP4 de la cepa de rotavirus Ku (serotipo 1) fue sintetizada a partir de cdna con el sistema de transcripción-traducción *in vitro* descrito en (47). La proteína marcada con metionina ³⁵S se utilizó para ensayar la inmunoreactividad de los sueros anti-CTB-Rod con VP4, por un ensayo de inmunoprecipitación. Brevemente, para la inmunoprecipitación en condiciones nativas, se incubaron 2µl de la proteína VP4 traducida *in vitro* con los sueros de ratones diluidos 1:10 en buffer RIPA (1% Triton X-100, 1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 150mM NaCl, 50mM tris pH7.5) por 30' a T.A. (la muestra de VP4 fue tratada con buffer RIPA con 0.5% SDS, e incubada a 94°C por 2', para inmunoprecipitación en condiciones desnaturalizantes); a la mezcla de sueros con VP4, se agregaron 25µl de proteína A-Sepharosa (Sigma) al 50%

en PBS, incubándose por 30' a T.A.. Las muestras fueron lavadas dos veces con buffer RIPA/1 mg/ml BSA, una vez con buffer RIPA, y tratadas con buffer disruptor (SDS 1%, β -mercaptoetanol 1%, EDTA 2mM, Glicerol 10%, tris 50mM pH6.8), y analizadas por SDS-PAGE.

Immunización de ratones con la proteína CTB-Ro4

Ratones Balb/C de 9 semanas de edad fueron inyectados por la vía subcutánea con 50 μ g de la fracción de periplasma de la proteína CTB-Ro4 (6 ratones) o CTB (5 ratones). La primera inmunización se hizo con adyuvante completo de Freund y en subsiguientes inmunizaciones se utilizó adyuvante incompleto. Los ratones fueron inmunizados cada dos semanas, 4 veces. Se obtuvieron sueros de sangrados anteriores a la primera inmunización (preinmunes) y de dos semanas después de cada inmunización subsiguiente (hiperinmunes). Los sueros fueron inactivados a 57°C por 1 hr y guardados a -70°C.

RESULTADOS

Construcción del gene híbrido ltb-Ro4-ctb.

Se construyó un gene híbrido que codifica para un péptido de la proteína VP4 de rotavirus fusionado al extremo amino terminal de la subunidad B de la toxina de cólera (CTB). El péptido incluido en la fusión, el cual llamamos Ro4, comprende del aminoácido 296 al 313 de VP4, y representa una secuencia que está completamente conservada entre los serotipos 1, 3 y 4 de rotavirus humanos (66,67). La secuencia de los oligonucleótidos empleados en la construcción, así como la secuencia del péptido Ro4 codificada por estos oligos, se muestra en la Fig. 5a. Los oligonucleótidos fueron diseñados con codones que son utilizados preferencialmente en *E.coli*. La inserción de estos oligonucleótidos entre los sitios *SacI* y *XmaI* del plásmido pJS752-3 genera el plásmido pJS/Ro4 (Fig. 4), el cual dirige la expresión del gene híbrido ltb-Ro4-ctb a partir del promotor *tac*. La proteína híbrida codificada por el plásmido pJS-Ro4 consiste del péptido líder de la subunidad B de la toxina termolabil (LTB) de *E. coli*, el péptido Ro4 y, la región de la proteína madura de CTB (Figs. 4 y 5b). Existen en esta proteína híbrida precursora dos sitios potenciales de procesamiento que corresponden a los sitios originales, tanto del péptido líder de LTB (ala 22) como de CTB (tir 25); este último es el sitio de procesamiento utilizado en la proteína LTB-CTB en ausencia del péptido Ro4 (58). Al insertarse éste, la tirosina 25 es desplazada al sitio 46, aumentando así la probabilidad de que el péptido líder sea procesado en la ala 22. Este procesamiento dejaría así intacto el epítipo de VP4 en el terminal amino de CTB.

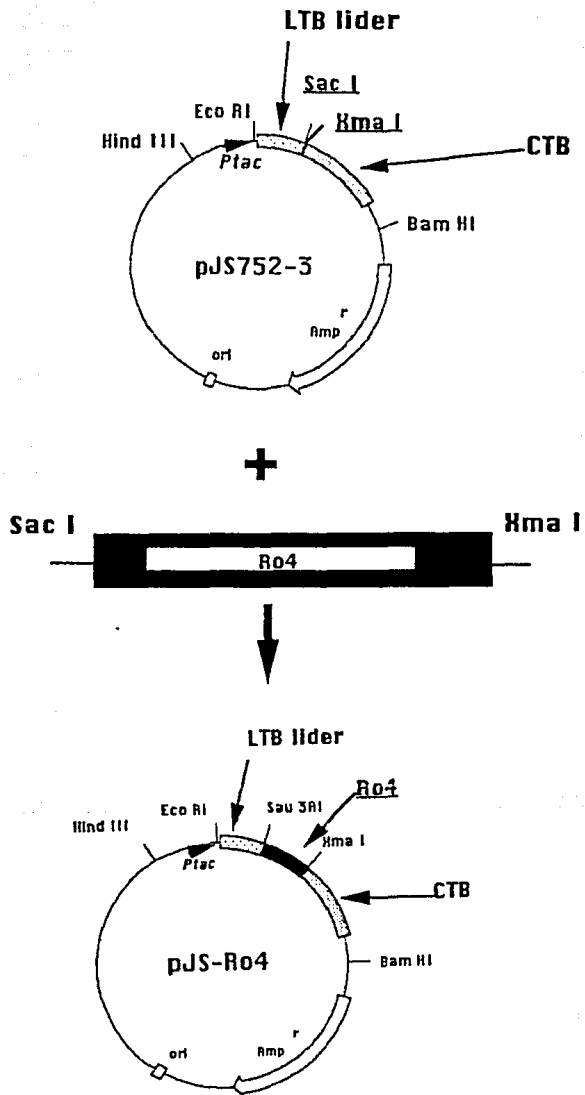
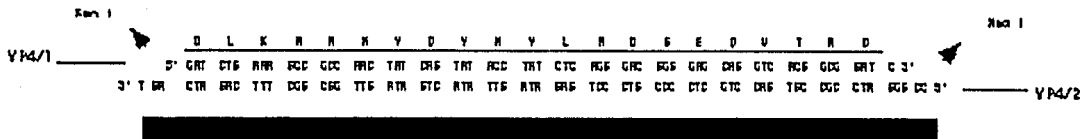


Fig. 4

Construcción del plásmido pJS-Ro4 a partir de pJS752-3 y oligonucleótidos vp4/1 y vp4/2. La inserción se llevó a cabo en los sitios de restricción Sac I y Xma I, como se señala. La caja gris punteada representa el gene de ctb, la caja blanca punteada el gene que codifica para el péptido líder de LTB y la caja negra el inserto de VP4. La flecha negra * representa al promotor PtaC.

a)



b)

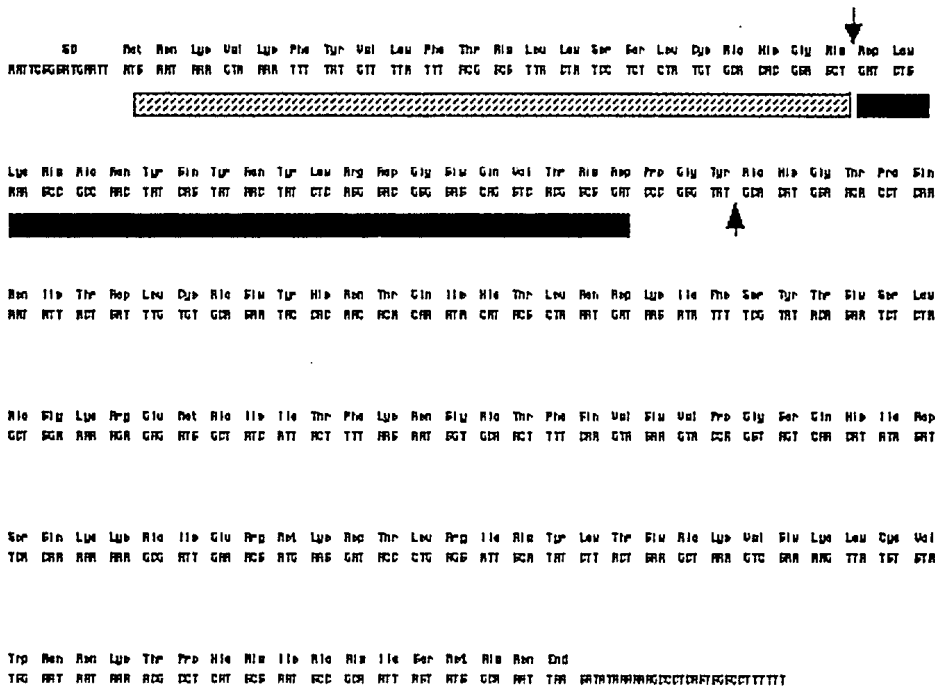


Fig. 5

a) Secuencia de los oligos vp4/1 y vp4/2 que codifican para el péptido Ro4. Se señalan los extremos con terminaciones cohesivas complementarias a los sitios generados por Sac I y Xba I en el plásmido pJ5752-3.
 b) Secuencia del gene híbrido ltb-ro4-ctb en el plásmido pJ5-Ro4, y secuencia deducida de aminoácidos. Subrayado con una barra punteada se señala la secuencia correspondiente al péptido líder de LTB, con una barra negra se subraya el péptido Ro4. ↓ Ala 22 en donde se espera el corte de procesamiento del péptido líder. ↑ representa el sitio de procesamiento del péptido líder de CTB. SD muestra el sitio Shine Dalgarno de unión a ribosomas.

Al determinar la estabilidad del plásmido pJS/Ro4 en la cepa de *E. coli* MC1061, se encontró que el número de bacterias en cultivo que mantienen resistencia a ampicilina no disminuyó, aún después de 40 generaciones en ausencia de la presión selectiva, demostrando que el plásmido es suficientemente estable para ser utilizado en la producción de la proteína híbrida.

Se determinó la secuencia del inserto en el plásmido pJS-Ro4 (Fig. 5a), corroborando que los oligonucleótidos se insertaron en una sola copia y en el marco de lectura correcto.

Antigenicidad de la proteína CTB-Ro4.

La proteína de fusión producida se analizó en un ensayo de ELISA-GM1. En este ensayo, lisados bacterianos, conteniendo o no la proteína de fusión, se añaden a pozos de placas de ELISA que han sido previamente cubiertos con el gangliosido GM1. Dado que este gangliosido tiene la capacidad de unirse de manera específica a CTB, esto permite capturar de entre todos los componentes del lisado bacteriano a las proteínas CTB y CTB-Ro4, las cuales pueden posteriormente ser detectadas con anticuerpos específicos.

Los ensayos realizados con sonicados totales de bacterias no transformadas o conteniendo los plásmidos pJS-Ro4 o pJS752-3 (Fig. 6), muestran reactividad específica con anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CTB (LT-39) y anti-péptido Ro4 (YO-2C2). La reactividad

de LT-39 tanto con la cepa portadora de pJS752-3 como con la cepa que contiene el plásmido pJS-Ro4, pero no con la cepa control, muestra la presencia de CTB en los sonicados celulares de las cepas transformantes. Asimismo, indica que la fusión no interfiere con la oligomerización de CTB ya que el mAb LT-39 reconoce solo la forma pentamérica de la molécula (posiblemente reconociendo una región que involucra la interfase entre los monómeros). La reactividad específica del mAb YO-2C2 con el sonificado de células portadoras de pJS-Ro4, indica que el péptido está presente en la proteína de fusión y que está expuesto en una conformación similar a la que naturalmente adopta en el contexto del virión. El hecho que el péptido pueda ser reconocido por el monoclonal YO-2C2 en el contexto de la proteína quimérica, aún cuando ésta se encuentra unida a GM1 sugiere, además, que el péptido de fusión y el dominio responsable de la unión a GM1 no interfieren estéricamente uno con el otro.

La presencia del péptido líder de LTB en el terminal amino de la proteína híbrida permite el transporte de la misma al espacio periplásmico en *E. coli*. Por lo tanto se aislaron fracciones de periplasma, y se obtuvo una preparación enriquecida de la proteína híbrida (Fig. 7).

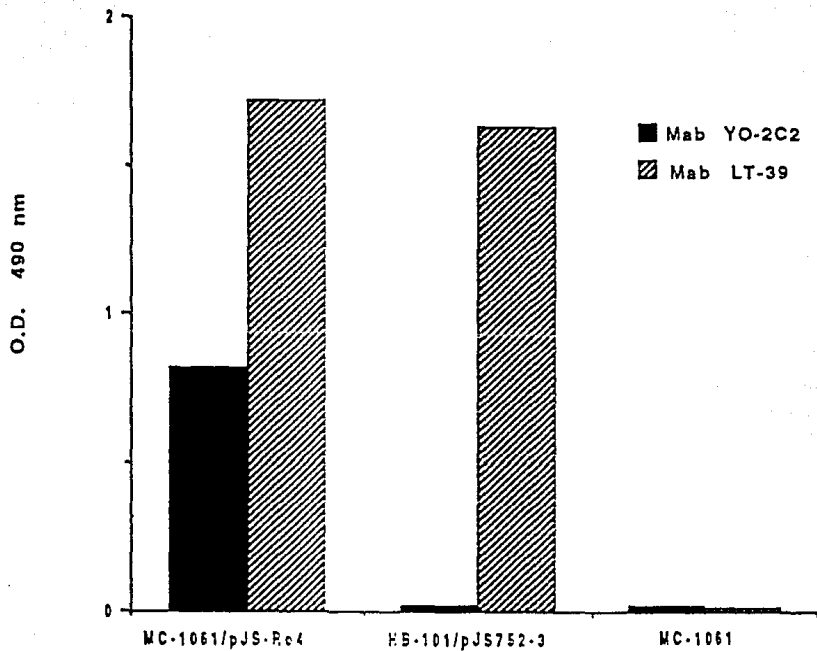
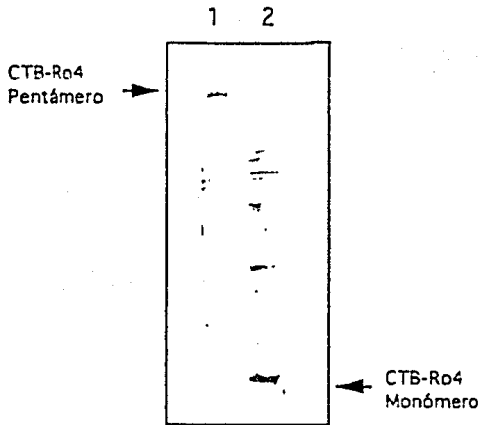


Fig. 6

Inmunoreactividad por ELISA-EMI de la proteína CTB-Ro4 en sonidos de células MC-1061/pJS-Ro4, HB-101/pJS-752-3 y MC-1061. Se muestra la reactividad de los Mab's LT-39 (anti-CTB) y YO-2C2 (anti-Ro4) con las tres cepas ensayadas. La concentración de sonidos celulares es equivalente para las tres cepas.

a) CTB-Ro4 de Periplasma de *E. coli*



b) CTB-Ro4/Monómero

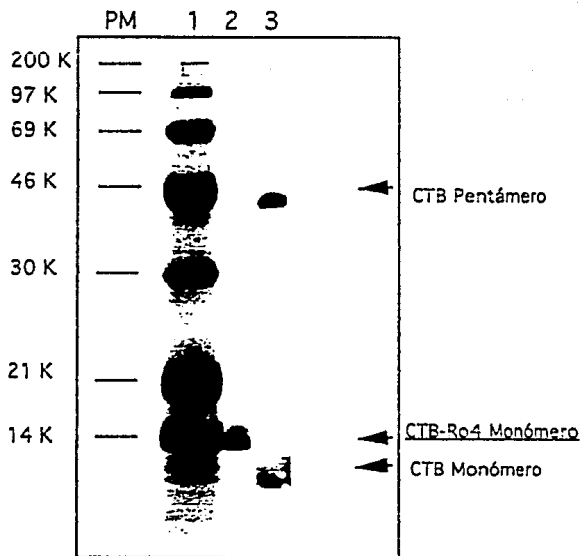


Fig. 7

a) Electroforesis en poliacrilamida/SDS de la proteína CTB-Ro4 aislada de periplasma de NC1061/pJS-Ro4. Carril 1 y 2 muestran el pentámero y monómero de la proteína híbrida respectivamente.

b) Electroforesis en poliacrilamida/SDS del monómero de la proteína CTB-Ro4. Carril 1: Marcadores estándar de Peso Molecular (Biorad). Carril 2: Monómero de CTB-Ro4 aislado de periplasma. Carril 3: Pentámero y monómero de CTB obtenida de una fuente comercial (Merieux, Francia).

Las proteínas obtenidas en los sonicados totales de células y la fracción periplasmática de las cepas transformantes y control se analizaron por ensayos de inmunoelectrotransferencia (Western blot). La estabilidad del pentámero de CTB permite su análisis en geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS en electroforesis (SDS-PAGE), ya que aún en presencia de β -mercaptoetanol y SDS mantiene su conformación oligomérica. La desnaturización del pentámero, para obtener la forma monomérica, se logra al llevar la proteína a temperaturas mayores de los 75°C en presencia de SDS. El análisis por inmunoelectrotransferencia de las formas monomérica y pentamérica de las proteínas CTB y CTB-Ro4 (Fig. 8) muestra que el pentámero híbrido es reconocido por los mAbs LT-39 y YO-2C2, mientras que el monómero solo es reconocido por el mAb dirigido contra el péptido de VP4, ya que como se mencionó anteriormente el mAb LT-39 solo reconoce al protómero B en su forma pentamérica. La migración aparente de los pentámeros sugiere su diferencia en peso molecular, aunque ésta no puede ser determinada debido a que las condiciones en las que se analiza no son desnaturizantes. El peso molecular aproximado del monómero híbrido por su migración aparente en SDS-PAGE es de $\approx 13,000$ Da. (Fig. 7), el cual es muy similar al peso molecular calculado de 14,141 da. El hecho que la proteína de fusión pueda ser aislada de periplasma sugiere que el péptido líder de LTB es procesado en esta construcción.

Anti-Ro4
YO-2C2

Anti-CTB
LT-39

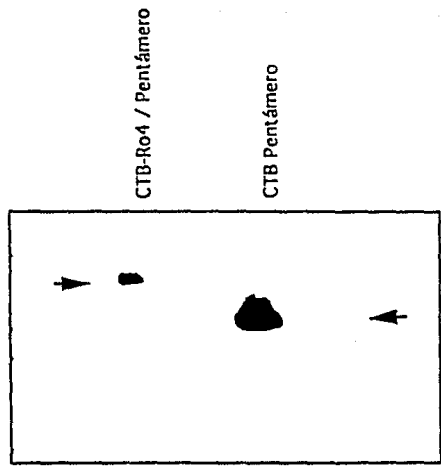
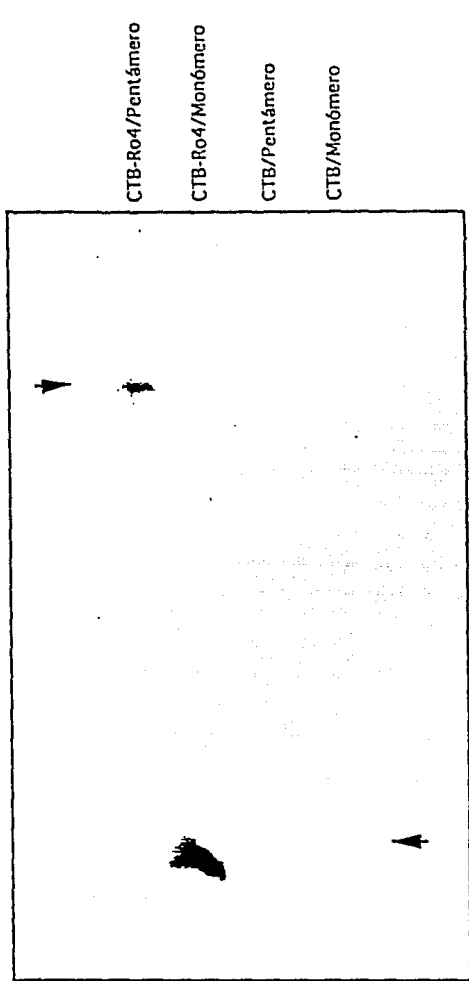


Fig. 8

Inmunoelctrotransferencia (Western Blot) con proteínas de periplasma:
Panel Anti-Ro4. Reactividad de mAb YO-2C2 con pentámero y monómero de CTB-Ro4. Pentámero CTB-Ro4 (Periplasma sin hervir). Monómero CTB-Ro4 (Periplasma hervido). Pentámero CTB (sin hervir). Monómero CTB (hervido).
Panel Anti-CTB. Reactividad de mAb LT-39 con pentámero de CTB y CTB-Ro4.

El análisis de la proteína por estos ensayos sugiere que la expresión del gene híbrido se lleva a cabo de la manera esperada, la proteína de fusión es producida, y tanto la síntesis, el transporte intracelular y el ensamblaje de la proteína quimérica se llevan a cabo correctamente.

Cuantificación de la Proteína CTB-Ro4 Sintetizada.

El promotor *tac* ha sido utilizado anteriormente para la sobreexpresión del gene CTB en cepas recombinantes (56). En este trabajo se determinó la concentración de la proteína de fusión CTB-Ro4 expresada en la cepa MC1061 de *E. coli*. Sonicados totales de las cepas MC1061/pJS-Ro4, HB101/pJS752-3 y MC1061/pJS752-3 (esta última con el propósito de determinar si ambas cepas de *E. coli* tenían un comportamiento similar en cuanto a producción y procesamiento de CTB) se analizaron por medio de ensayos de ELISA-GM1, haciendo diluciones en serie de las muestras y determinando el nivel de reactividad con los mAbs LT-39 y YO-2C2 (Fig. 9). La concentración en cada muestra se determinó utilizando un estándar de CTB pura y de concentración conocida, y asumiendo que la reactividad de CTB-Ro4 con GM1 es igual a la de CTB. La concentración total de la proteína híbrida en la cepa MC1061/pJS-Ro4 fue en todos los casos alrededor del 20% al 30% en relación a la concentración de la proteína CTB en las cepas HB101/pJS752-3 y

MC1061/pJS752-3: 0.2 a 0.3µg/ml de cultivo. Estos resultados son similares a los obtenidos previamente por Sánchez y colaboradores en cepas de *E. coli*, con plásmidos que contienen el promotor *tac* (Sánchez J., comunicación personal).

Evaluación de la Inmunogenicidad de CTB-Ro4.

Uno de los aspectos más relevantes del presente proyecto es el de evaluar la capacidad de la proteína híbrida para inducir una respuesta inmune neutralizante. Con este fin, se inmunizaron ratones Balb/C de nueve semanas, por vía subcutánea, con la proteína CTB-Ro4 o CTB, utilizando las proteínas obtenidas de fracciones periplasmáticas. La respuesta inmune humoral de los ratones inmunizados se evaluó por su capacidad para reconocer en ensayos de ELISA, 1) al péptido sintético Ro4, 2) al pentámero de CTB, y 3) a partículas virales completas. Se probó también la capacidad de los sueros hiperinmunes para reaccionar con la proteína VP4 soluble por inmunoprecipitación, y para neutralizar la infección del virus *in vitro*.

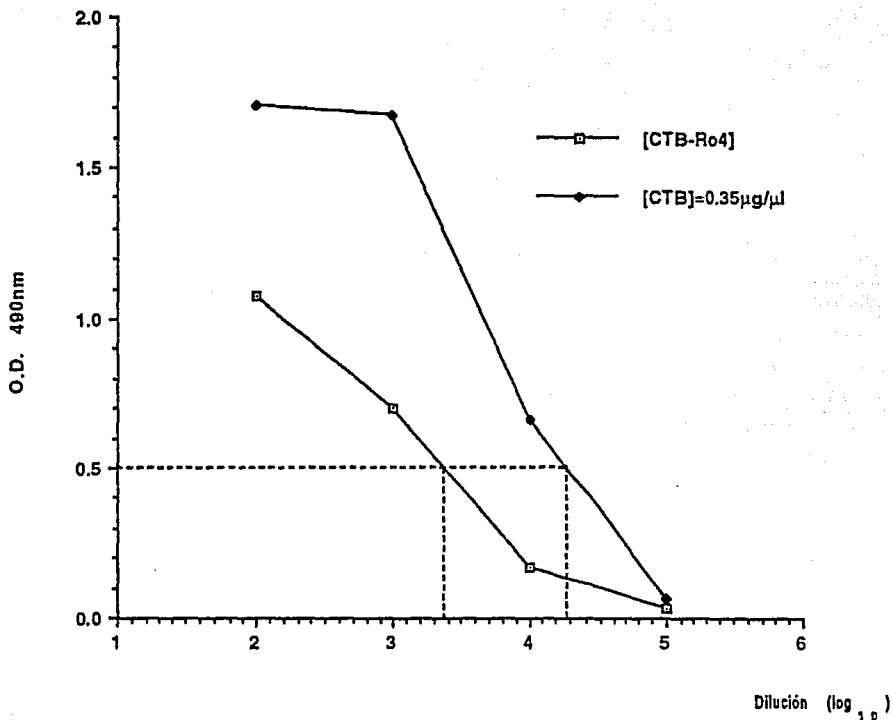


Fig. 9

Concentración de CTB-Ro4 en MC-1061/p36-Ro4 por medio de ELISA-GMI. La concentración de CTB-Ro4 se obtiene comparando la dilución con la cual se obtiene una $OD_{490nm}=0.5$ (línea punteada) con la proteína CTB-Ro4 en sonidos totales, a un control de CTB (Merieux) de concentración conocida ($0.35\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Se asume que la reactividad de CTB-Ro4 con GMI es igual a la de CTB.

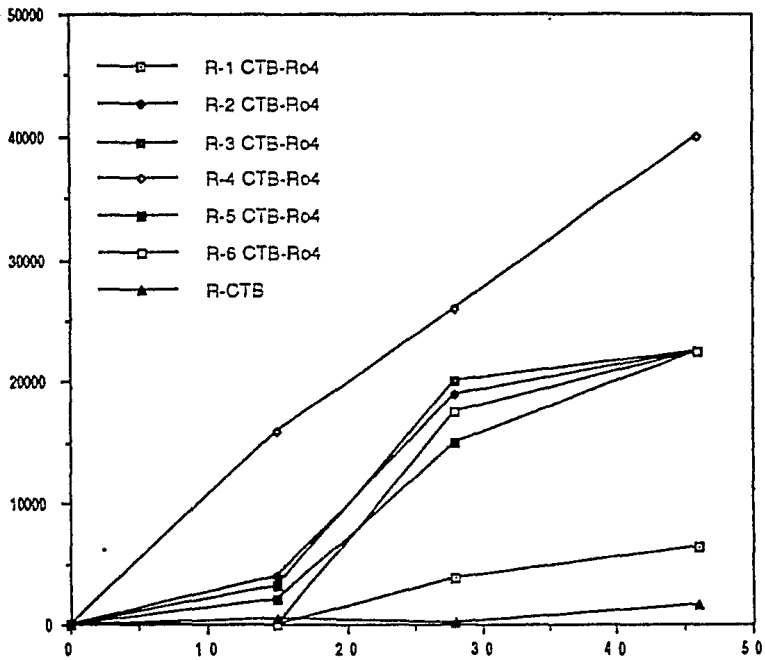
Reactividad de Sueros con el Péptido Sintético Ro4 y con CTB.

Se llevaron a cabo ensayos de ELISA para determinar la presencia en los sueros hiperinmunes de anticuerpos que reconocieran al péptido Ro4. Encontramos que los ratones que se inmunizaron con la proteína híbrida CTB-Ro4 tienen anticuerpos anti-péptido con títulos que alcanzan hasta 2×10^4 (el título se define como la dilución más alta del suero con la que se obtiene una señal mayor o igual a una OD_{490nm} de 0.2), mientras que los sueros de ratones inmunizados con CTB no dieron señal positiva (Fig. 10). Por otro lado, los sueros de los ratones inmunizados con CTB-Ro4 fueron capaces de reconocer en un ensayo de ELISA-GM1 a la proteína CTB, obteniendo títulos superiores a aquellos obtenidos contra el péptido de fusión (Fig 11).

Reactividad de Sueros con Rotavirus por Ensayos de ELISA.

Las cepas Wa y ST3, pertenecientes a los serotipos 1 y 4 respectivamente, fueron utilizadas para ensayar la inmunoreactividad de los sueros con partículas virales completas. Se realizaron ensayos con lisados de células MA104 infectadas con rotavirus, así como con virus purificado por gradientes de CsCl (tabla II). En ningún caso se pudieron detectar anticuerpos en los sueros hiperinmunes que reaccionaran con el virus.

Título de Aca. vs. Peptido en sueros



Días

Fig. 10

Título por ELISA de anticuerpos dirigidos contra el péptido Ro4. Se incluyen los sueros de todos los ratones inmunizados con la proteína CTB-Ro4, y el promedio obtenido con los sueros de ratones inmunizados con CTB como control.

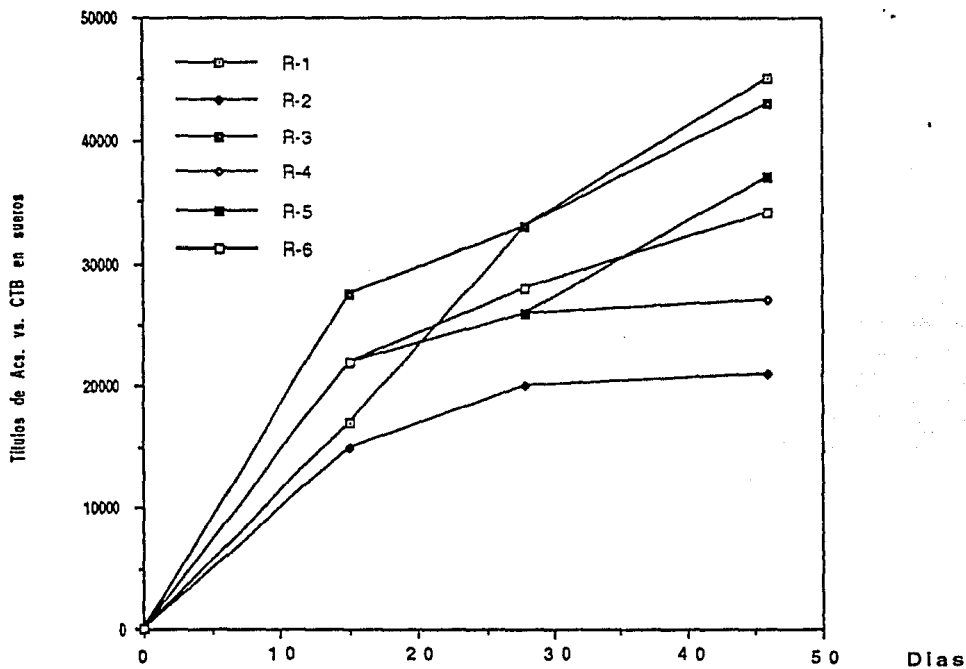


Fig. 11

Título de anticuerpos CTB-específicos por ELISA-GM1 en sueros de ratones inmunizados con la proteína CTB-Ro4.

Ensayos de Neutralización.

Se llevaron a cabo ensayos de neutralización analizando la reducción de focos de infección en células MA104. Considerando que el epítoto de VP4 utilizado en este estudio está totalmente conservado en cepas humanas de rotavirus de serotipo 1, 3 y 4, las cepas de rotavirus Wa (serotipo 1), ST3 (serotipo 4) e Ito (serotipo 3) fueron utilizadas para analizar la capacidad neutralizante de los sueros obtenidos, y su posible reactividad cruzada con los tres serotipos. Se analizaron sueros de ratones inmunizados con las proteínas CTB-Ro4 o CTB (tabla II). No se pudo detectar actividad neutralizante en ninguno de los sueros probados, lo cual indica que los anticuerpos producidos contra la proteína de fusión no tienen capacidad neutralizante, al menos detectable por estos ensayos.

Reactividad de Sueros con VP4 Soluble.

Con el objeto de detectar anticuerpos en los sueros de ratones inmunizados con CTB-Ro4 que aunque no pudieran ser detectados por reactividad con partículas virales completas en ensayos de ELISA y que no tuvieran capacidad neutralizante, tuvieran la capacidad de reconocer al epítoto Ro4 en el contexto de la proteína VP4 soluble, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación, tanto en condiciones

nativas como, desnaturalizantes. Los resultados mostraron que los sueros no tienen un nivel detectable de anticuerpos que pueda reconocer a VP4 (tabla II). En estos ensayos se incluyeron dos controles negativos: En el primero las proteínas de rotavirus marcadas con ^{35}S Met fueron incluidas en el ensayo en ausencia de suero, obteniendo así el fondo mínimo de señal. El segundo control negativo constó en incluir los sueros preinmunes de los ratones inmunizados. En ambos casos se obtuvo una señal similar. Se ensayaron los sueros de todos los ratones inmunizados con la proteína híbrida; la señal obtenida fue similar a los controles negativos. El control positivo fue el Mab YO-2C2 dirigido específicamente contra el epítipo de interés en VP4; en condiciones desnaturalizantes se observó una señal tenue correspondiente a VP4, mientras que una señal más intensa se observó en condiciones nativas, indicando que YO-2C2 tiene menor reactividad con la proteína desnaturalizada.

TABLA II. RESUMEN DE LAS PROPIEDADES INMUNOREACTIVAS DE SUEROS DE RATONES INMUNIZADOS CON LAS PROTEINAS CTB-Ro4 O CTB.

Ratón n° /Suero	Título ELISA (a)			Neutralización(b)	Inmuno- precipitación(c)
	Anti-Péptido	Anti-CTB	Anti-RU		
R-1CTRo4	1:6,400	1:45,000	≤1:100	≤1:20	-
R-2CTRo4	1:20,000	1:20,000	≤1:100	≤1:20	-
R-3CTRo4	1:20,000	1:42,000	≤1:100	≤1:20	-
R-4CTRo4	1:40,000	1:25,000	≤1:100	≤1:20	-
R-5CTRo4	1:20,000	1:35,000	≤1:100	≤1:20	-
R-6CTRo4	1:20,000	1:32,000	≤1:100	≤1:20	-
R-1 to 6 CTB	1:1,000	ND	≤1:100	≤1:20	-
Y0-2C2	1:6,400	---*	1:3,200	1:3,200	+
Anti-YM	ND	ND	1:12,000	ND	+
Anti-ST-3	ND	ND	ND	1:3,200	ND
Anti-Wa	ND	ND	1:2,000	1:1,600	ND

a) Títulos de ELISA se expresan como la dilución final de los sueros en la que se obtiene una O.D.490nm ≥ 0.20 , habiendo restado los valores de fondo obtenido en ausencia de antígeno.

b) Ensayo de Reducción de Focos de Peroxidasa. Los títulos se expresan como la dilución final de los sueros con la que se obtiene una reducción de focos de peroxidasa ≥ 60%, habiendo restado los valores de fondo obtenidos con los sueros control.

c) Ensayo de Inmunoprecipitación de UP4.

ND , No determinado.

* ---, no se observó reactividad.

DISCUSSION

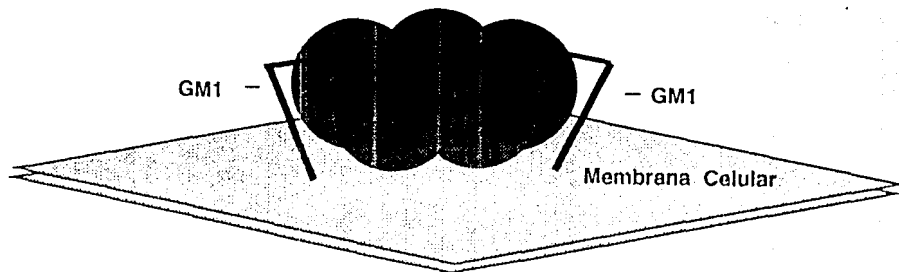
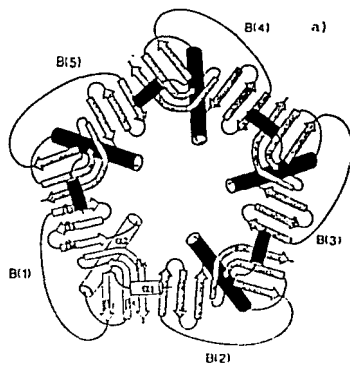
En este trabajo llevamos a cabo la construcción de un gene híbrido que codifica para la proteína quimérica denominada CTB-Ro4. Este gene se expresa bajo el control del promotor *tac*, el cual ha sido previamente utilizado para expresar tanto CTB como proteínas de fusión a CTB en *E. coli*, obteniéndose niveles de alrededor de 1µg y 0.2µg de proteína por ml de cultivo, respectivamente (Sanchez J. comunicación personal). En nuestro caso el gene híbrido *ltb-Ro4-ctb* se expresó en *E. coli* a los niveles esperados, obteniéndose de 0.2 a 0.3µg de CTB-Ro4/ml de cultivo (Fig. 9). La proteína sintetizada se exporta al espacio periplásmico, facilitando así su enriquecimiento y purificación.

El hecho que la proteína de fusión pueda ser recuperada del espacio periplásmico sugiere que el péptido líder de LTB se procesa, posiblemente en su sitio de procesamiento original (ala 22), ya que el sitio de procesamiento del péptido líder de CTB (tir 25) es desplazado hasta el residuo 46 de la proteína híbrida. El corte en ala 22 generaría un extremo amino terminal con la secuencia que corresponde al péptido de fusión (DLKAANYQYNYLRDGEQVTA), éste consta del epítipo Ro4, y de dos aminoácidos adicionales (aspártico y leucina), introducidos en la construcción del plásmido pJS-Ro4.

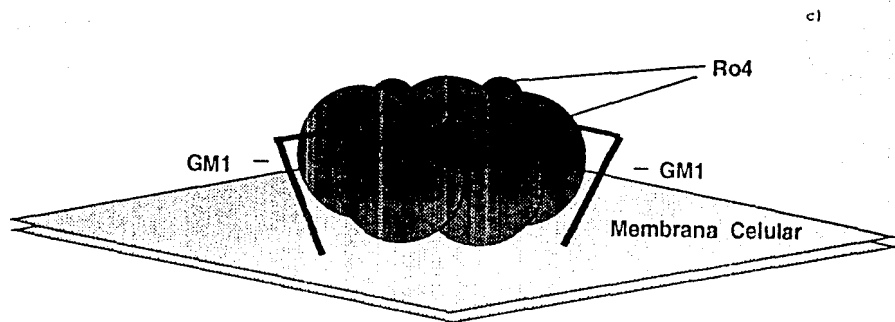
Durante el transcurso de este estudio se publicó la estructura cristalográfica de LT (62), la cual se describe en la Fig. 12a. La molécula consta de dos grupos de tres cadenas de estructuras β -plegadas antiparalelas, y de dos α -hélices. Una de las α -hélices,

constituida por los aminoácidos 4 al 9, se localiza en la superficie exterior del pentámero, lo cual sugiere que el extremo amino de la proteína está expuesto en el exterior de la molécula. El dominio de interacción de LTB con el receptor celular GM1 se localiza en una cavidad en la parte "superior" de la molécula, en donde el aminoácido 88 (triptofano) parece ser el sitio de interacción con la galactosa terminal de GM1. Se postula además que el pentámero se une a la célula de manera paralela, con la parte "inferior" localizándose cerca de la membrana celular (Fig. 12b). Esta superficie, especialmente plana, está a una distancia de ≈ 23 Å del sitio propuesto (trp 88) para unión a GM1, mientras que el gangliosido GM1 se extiende hacia fuera de la célula con una longitud aproximada de 25 Å, alcanzando posiblemente el extremo opuesto del pentámero.

De esta manera, el extremo amino terminal de LTB puede localizarse en la parte "superior" de la molécula, cuando ésta interacciona con GM1. Dado el alto grado de homología (80%) que existe entre la estructura primaria de LT y CT, es razonable asumir que la estructura tridimensional de CT debe ser similar a la de LT. De acuerdo a esto, el péptido Ro4 en la proteína de fusión CTB-Ro4 se encontraría en la superficie externa de la molécula, situado en la parte "media" a "superior" del pentámero (Fig. 12c). Esta interpretación es consistente con los datos de ELISA obtenidos en el presente estudio, en donde el péptido Ro4, en el híbrido CTB-Ro4, está accesible para interactuar con el mAb YO-2C2. A través



LTB



CTB-Ro4

Fig. 13

a) Esquema de la estructura de LTB, b) modelo diagramático de la conformación de LTB y c) de la posible conformación de CTB-Ro4. Se señala el sitio de fusión a CTB del péptido de VP4 y la posible orientación del mismo en la quimera.

de los ensayos de ELISA-GM1 e inmunoblot demostramos que la proteína CTB-Ro4 tiene la propiedad de formar pentámeros y de ser reconocida por mAbs dirigidos contra ambas partes en la fusión. El hecho que el mAb YO-2C2 pueda interaccionar con el péptido Ro4 en el contexto de la molécula pentamérica cuando ésta última se encuentra unida a GM1, indica que los sitios de unión al mAb YO-2C2 y a GM1 no interfieren estericamente entre sí y por lo tanto no se encuentran cercanos en la superficie de la molécula.

El análisis realizado con los sueros de ratones inmunizados con la proteína periplasmática CTB-Ro4 indica que el híbrido tiene la capacidad de inducir anticuerpos específicos, tanto contra CTB, como contra el péptido de fusión de VP4. Sin embargo estos sueros no son capaces de interaccionar con el epítoto Ro4 en el contexto de la proteína VP4 o del virus completo, como lo indica su incapacidad para reconocer a VP4 en un ensayo de inmunoprecipitación, tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes, y al virus en ensayos de ELISA y neutralización.

El hecho que el mAb YO-2C2 fuera capaz de reconocer con títulos similares al péptido Ro4, a la proteína híbrida CTB-Ro4 y al rotavirus ST3 en un ensayo de ELISA, así como al virus ST3 en ensayos de neutralización (tabla II), sugiere que la sensibilidad de los ensayos de ELISA y de neutralización de rotavirus, con este mAb en particular, es aproximadamente la misma.

Tomando esto en consideración, esperaríamos que los sueros anti-CTB-Ro4, los cuales reaccionaron con títulos relativamente altos (2×10^4) contra el péptido por ELISA, tuvieran también la capacidad de interaccionar con el virus en los ensayos de ELISA y neutralización, con títulos similares. Sin embargo, como se menciona anteriormente, esto no sucede.

Estas observaciones pudieran explicarse si el epítoto que reconoce el mAb YO-2C2, fuera poco o no inmunogénico en el contexto de la proteína CTB-Ro4, y la gran mayoría de los anticuerpos inducidos por el péptido Ro4 en la proteína híbrida estuvieran dirigidos contra regiones del péptido diferentes a la del epítoto de YO-2C2, o bien contra la región que contiene este epítoto, pero con una conformación diferente a la que se encuentra en el virión. Otro tipo de anticuerpos que podrían estar presentes en los sueros hiperinmunes y reaccionar con el péptido Ro4, pero no con el virus, serían anticuerpos inducidos por epítotos compartidos entre CTB y el péptido Ro4. Finalmente, en una respuesta inmune celular de los animales inmunizados, el procesamiento de la proteína y presentación del péptido podría inducir anticuerpos que reconozcan al péptido sintético soluble, pero no al péptido en el contexto del virión.

Lo que resulta paradójico es que el mAb YO-2C2 reconozca de manera eficiente al péptido Ro4 en la proteína CTB-Ro4, indicando que el epítoto de YO-2C2 en este contexto es un buen antígeno; sin embargo, como se discute anteriormente, este epítoto parecería

tener una pobre o nula inmunogenicidad. Existen antecedentes para este tipo de comportamiento en algunos epítopes. En poliovirus una serie de anticuerpos monoclonales neutralizantes producidos inmunizando animales con partículas virales completas, reconocen a péptidos sintéticos que mimetizan secuencias específicas de una proteína de superficie del virus (VP1); sin embargo, estos péptidos no tienen la capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes contra el virus (20).

Una alternativa interesante en la caracterización inmunológica de la proteína de fusión CTE-Ro4 es la capacidad potencial que ésta pueda tener para sensibilizar al sistema inmune. Arias y colaboradores reportaron que el péptido que comprende los aminoácidos 220 a 233 de VP4, aunque no induce per se anticuerpos neutralizantes contra el virus cuando se utiliza para inmunizar ratones, si tiene la capacidad de sensibilizar la respuesta inmune de estos animales. Esta sensibilización se hace evidente cuando ratones previamente inmunizados con el péptido se inmunizan subsecuentemente con partículas virales completas, obteniéndose una respuesta de anticuerpos neutralizantes incrementada en relación a ratones que no fueron previamente inmunizados con el péptido (4). El trabajo de Emini y colaboradores con poliovirus señala que algunos péptidos que mimetizan epítopes neutralizantes, tienen la capacidad de sensibilizar la respuesta inmune, produciendo anticuerpos neutralizantes al retar con partículas virales a animales previamente inmunizados con péptidos que no inducen una respuesta inmune neutralizante (20).

La capacidad de la proteína CTB-Ro4 para sensibilizar la respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes queda por ser evaluada. Este tipo de respuesta es relevante en el caso de rotavirus, donde una vacuna pretende, más que evitar la infección por el virus, eliminar o disminuir la severidad en los síntomas clínicos de la enfermedad.

Entre las posibles alternativas para mejorar la inmunogenicidad del epítoto de YO-2C2 puede estar el probar diferentes vías y esquemas de inmunización, así como diferentes razas o poblaciones "abiertas" de ratones, u otras especies animales, ya que es posible que la raza de ratones empleada (Balb/C) no sea responsiva para el epítoto de YO-2C2.

Otra alternativa es la de localizar el péptido en diferentes sitios "permisivos" de la proteína acarreadora, como podrían ser el extremo carboxilo terminal o la región expuesta inmunodominante que se encuentra alrededor del aminoácido 64 de CTB, asimismo, podrían emplearse otras proteínas acarreadoras. En este sentido es interesante mencionar que el epítoto Ro4 ha sido fusionado a la proteína OmpC de *S. typhi*, quedando localizado en una de las regiones expuestas de esta proteína de membrana externa (J.L. Puente, comunicación personal). En este contexto, el péptido es reconocido también eficientemente por el mAb YO-2C2 y será interesante determinar si esta construcción induce anticuerpos que sean capaces de reaccionar con el virus y de neutralizarlo.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican, aunque no se hayan obtenido anticuerpos neutralizantes, que la producción de proteínas de fusión por medio de métodos de DNA recombinante presenta una alternativa promisorio para el desarrollo de inmunógenos; sin embargo, es evidente que los detalles del diseño de las proteínas de fusión, así como de la estrategia empleada para inducir una respuesta inmune potencialmente protectora, deben ser estudiados cuidadosamente.

BIBLIOGRAFIA

1. Edwin L. Anderson, Robert B. Belshe, Julie Bartram, Francis Crookshanks-Newman, Robert M. Chanock, and Albert Z. Kapikian. 1986. Evaluation of Rhesus Rotavirus Vaccine (MMU18006) in Infants and Young Children. *The Journal of Infect. Dis.* 153:823-831
2. Marion E. Andrew, David B. Boyle, Barbara E.H. Coupar, Peter Whitfield, Gerald W. Both, and A. Richard Bellamy. 1987. Vaccinia Virus Recombinants Expressing the SA11 Rotavirus VP7 Glycoprotein Gene Induce Serotype-Specific Neutralizing Antibodies. *J. Virol.* 61:1054-1060.
3. Carlos F. Arias, Teresa Ballado, and Magda Plebaňsky. 1986. Synthesis of the Outer-Capsid Glycoprotein of the Simian Rotavirus SA11 in Escherichia coli. *Gene.* 47:211-219.
4. Carlos F. Arias, Gabriela Garcia, and Susana Lopez. 1989. Priming for Rotavirus Neutralizing Antibodies by a VP4 Protein-Derived Synthetic Peptide. *J. Virol.* 63:5393-5398.
5. Carlos F. Arias, Marcela Lizano and Susana Lopez. 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.
6. Babiuk, L. A., K. Mohammed, L. Spence, M. Fauvel, R. Petro. 1977. Rotavirus Isolation and Cultivation in the presence of Trypsin. *J. Clin. Microbiol.* 6:610-617.
7. Dorsey M. Bass, Erich R. Mackow, and Harry B. Greenberg. 1991. Identification and Partial Characterization of a Rhesus Rotavirus Binding Glycoprotein on Murine Enterocytes. *Virology.* 183:602-610.
8. Bishop R. F., Davidson G. P., Holmes I. H., Ruck B. J. 1973. Virus Particles in Epithelial Cells of Duodenal Mucosa from Children with Viral Gastroenteritis. *Lancet.* 2:1281-1283.
9. Jean Claude Boulain, Alain Charbit, Maurice Hofnung. 1986. Mutagenesis by Random Linker Insertion into the lamB Gene of Escherichia coli K-12. *Mol. Gen. Genet.* 205: 339-348.
10. John W. Burns, Harry B. Greenberg, Robert D. Shaw, and Mary K. Estes. 1988. Functional and Topographical Analyses of Epitopes on Hemagglutinin (VP4) of a Simian Rotavirus SA11. *J. Virol.* 62: 2164-2172.
11. Alain Charbit, Jean Claude Boulain, Antoinette Ryter, and Maurice Hofnung. 1986. Probing the Topology of a Bacterial Membrane Protein by Genetic Insertion of a Foreign Epitope; Expression at the Cell Surface. *EMBO.* 5:3029-3037.

12. A. Charbit, S. van der Werf, V. Mimie, J. C. Boulain, M. Girard, and M. Hofnung. 1988. Expression of a Poliovirus Neutralization Epitope at the Surface of Recombinant Bacteria: First Immunization Results. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 139: 45-58.
13. Dayue Chen, Mary K. Estes, and Robert F. Ramig. 1992. Specific Interactions Between Rotavirus Outer-Capsid Proteins VP4 and VP7 Determine Expression of a Cross-Reactive, Neutralizing VP4-Specific Epitope. *J. Virol.* 66:432-439.
14. H. Fred Clark, Francis E. Borian, Louis M. Bell, Karen Modesto, Vera Gouvea, and Stanley A. Plotkin. 1988. Protective Effect of WC3 Vaccine Against Rotavirus Diarrhea in Infants During a Predominantly Serotype 1 Rotavirus Season. *J. Infect. Dis.* 158: 570-586.
15. Scott M. Clark, John R. Roth, Martha L. Clark, Bill B. Barnett, and Rex S. Spendlove. 1981. Trypsin Enhancement of Rotavirus Infectivity: Mechanism of Enhancement. *J. Virol.* 39:816-822.
16. John D. Clements, David A. Sack, Jeffrey R. Harris, J. Chakraborty, P. K. Neogy, B. Stanton, N. Huda, M. U. Khan, Bradford A. Kay, M. R. Khan, M. Ansaruzzaman, M. Yunus, M. Raghava Rao, Ann-Mari Svenerholm, and Jan Holmgren. 1988. Cross-Protection by B Subunit-Whole Cell Cholera Vaccine Against Diarrhea Associated with Heat-Labile Toxin Producing Enterotoxigenic Escherichia coli: Results of a Large Scale Field Trial. *J. Infect. Dis.* 158: 372-377.
17. P. DeMol, G. Zissis, J.P. Butzler, A. Mutwewingabo, F.E. André. 1986. Failure of Live, Attenuated Oral Rotavirus Vaccine. *Lancet*:108.
18. Mark T. Dertzbaugh, Darrell L. Peterson, and Francis L. Macrina. 1990. Cholera Toxin B-Subunit Gene Fusion: Structural and Functional Analysis of the Chimeric Protein. *J. Bacteriol.* 58: 70-79.
19. Frédéric Ducancel, Jean-Claude Boulain, Odile Trémeau, and André Menéz. 1989. Direct Expression in E. coli of a Functionally Active Protein A-Snake Toxin Fusion Protein. *Protein Engineering.* 3: 139-143.
20. Emilio A. Emini, Bradford A. Jameson, Eckard Wimmer. 1983. Priming for and Induction of Anti-Poliovirus Neutralizing Antibodies by Synthetic Peptides. *Nature.* 304:699-703.
21. Mary K. Estes, Jean Cohen. 1989. Rotavirus Gene Structure and Function. *Microbiol. Rev.* 53: 410-449.

22. Mary K. Estes, Sue E. Crawford, Maria E. Penaranda, Betty L. Petrie, John W. Burns, Wai-Kit Chan, Brad Ericson, Gale E. Smith, and Max D. Summers. 1987. Synthesis and Immunogenicity of the Rotavirus Major Capsid Antigen Using a Baculovirus Expression System. *J. Virol.* 61: 1488-1494.
23. Estes M. K., D. Y. Graham, B. B. Mason. 1981. Proteolytic Enhancement of Rotavirus Infectivity: Molecular Mechanisms. *J. Virol.* 39:879-888.
24. Lucia Fiore, Harry B. Greenberg, and Erich R. Mackow. 1991. The VP8 Fragment of VP4 Is the Rhesus Rotavirus Hemagglutinin. *Virology.* 181: 1-11.
25. Jorge Flores, Marino Gonzalez, Mireya Perez, Walter Cunto, Irene Perez-Schael, Dorys Garcia, Naimeh Daoud, Robert M. Chanock, Albert Z. Kapikian. 1987. Protection Against Severe Rotavirus Diarrhea by Rhesus Rotavirus Vaccine in Venezuelan Infants. *Lancet.* 882-884.
26. Jorge Flores y Albert Z. Kapikian. 1988. en *Enfermedades Diarreicas en el niño.* 9a Edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. Capítulo 10.
27. Norio Fukuhara, Osamu Yoshie, Setsuko Kitacka, and Tasuke Konno. 1988. Role of VP3 in Human Rotavirus Internalization After target Cell Attachment via VP7. *J. Virol.* 62: 2209-2218.
28. Beth Goins and Ernesto Freire. 1988. Thermal Stability and Intersubunit Interactions of Cholera Toxin in Solution and in Association with Its Cell-Surface Receptor Ganglioside GM1. *Biochemistry.* 27: 2046-2052.
29. Mario Gorziglia, Kim Green, Kazuo Nishikawa, Koki Taniguchi, Ronald Jones, Albert Z. Kapikian, and Robert M. Chanock. 1988. Sequence of the Fourth Gene of Human Rotaviruses Recovered from Asymptomatic and Symptomatic Infections. *J. Virol.* 62: 2978-2984.
30. Mario Gorziglia, Yasutaka Hoshino, Alicia Buttler-White, Ilse Blumentals, Roger Glass, Jorge Flores, Albert Z. Kapikian, and Robert M. Chanock. 1986. Conservation of Amino Acid Sequence of VP8 and Cleavage Region of 84-kDa Outer Capsid Protein among Rotaviruses Recovered from Asymptomatic Neonatal Infection. *P.N.A.S. USA* 83:7039-7043.
31. M. Gorziglia, K. Nishikawa, Y. Hoshino, and K. Taniguchi. 1990. Similarity of the Outer Capsid Protein VP4 of the Gottfried Strain of Porcine Rotavirus to that of Asymptomatic Human Rotavirus Strains. *J. Virol.* 64: 414-418.

32. Kim Y. Green and Albert Z. Kapikian. 1992. Identification of VP7 Epitopes Associated with Protection Against Human Rotavirus Illness or Shedding in Volunteers. *J. Virol.* 66:548-553.
33. Jan Holmgren. 1981. Actions of Cholera Toxin and the Prevention and Treatment of Cholera. *Nature.* 292:413-417.
34. Kaarel T. Kaljot, Robert D. Shaw, Donald H. Rubin, and Harry B. Greenberg. 1988. Infectious Rotavirus Enter Cells by Direct Cell-Membrane Penetration not by Endocytosis. *J. Virol.* 62:1136-1144.
35. Albert Z. Kapikian, Jorge Flores, Yasutaka Hoshino, Roger I. Glass, Karen Midthun, Maric Gorriglia, and Robert M. Chanock. 1986. Rotavirus: The Major Etiologic Agent of Severe Infantile Diarrhea may Be Controllable by a "Jennerian" Approach to Vaccination. *J. Infect. Dis.* 153:815-821.
36. Kapikian A. Z., Chanock R. M. 1985. Rotaviruses. in Fields B. N., Knipe D. M., Chanock R. M., Melnick J. L., Roizman B., Shope R. E., eds. *Virology.* New York: Raven Press. 863-906.
37. A. Kumar, A. Charpilienne, and J. Cohen. 1989. Nucleotide Sequence of the Gene Encoding for the RNA Binding Protein (VP2) of RF Bovine Rotavirus. *N.A.R.* 17:2126
38. Claudio F. Lanata, Robert E. Black, Roberto del Aguila, Ana Gil, Hector Berastegui, Giuseppe Gerna, Jorge Flores, Albert Z. Kapikian, and Francis E. André. 1989. Protection of Peruvian Children Against Rotavirus Diarrhea of Specific Serotypes by One, Two or Three Doses of the RIT 4237 Attenuated Bovine Rotavirus Vaccine. *J. Infect. Dis.* 159: 452-458.
39. Claude Leclerc, Alain Charbit, Annie Molla, and Maurice Hofnung. 1989. Antibody Response to a Foreign Epitope Expressed at the Surface of Recombinant Bacteria: Importance of the Route of Immunization. *Vaccine.* 7: 242-248.
40. Claude Leclerc, Pierre Martineau, Sylvie Van der Werf, Edith Deriaud, Pascal Duplay, and Maurice Hofnung. 1990. Induction of Virus Neutralizing Antibodies by Bacteria Expressing the C-3 Poliovirus Epitope in the Periplasm. *J. Immunol.* 144: 3174-3182.
41. Marcela Lizano, Susana Lopez, and Carlos F. Arias. 1991. The Amino Terminal Half of Rotavirus SA114fM VP4 Protein Contains a Hemagglutination Domain and Primes for Neutralizing Antibodies to the Virus. *J. Virol.* 65: 1383-1391.

42. Susana Lopez, Carlos F. Arias, John R. Bell, James H. Strauss and Romilio T. Espejo. 1985. Primary of the Cleavage Site Associated with Trypsin Enhancement of Rotavirus SA11 Infectivity. *Virology*. 144: 11-19.
43. Susana Lopez, Carlos F. Arias, Ernesto Mendez, and Romilio T. Espejo. 1986. Conservation in Rotaviruses of the Protein Region Containing the two Sites Associated with Trypsin Enhancement of Infectivity. *Virology*. 154: 224-227.
44. Susana Lopez, Imelda Lopez, Pedro Romero, Ernesto Mendez, Xavier Soberon, and Carlos F. Arias. 1991. Rotavirus YM gene 4: Analysis of its Deduced Amino Acid Sequence and Prediction of the Secondary Structure of the VP4 Protein. *J.Virol.* 65: 3738-3745.
45. Erich R. Mackow, Jim W. Barnett, Hardy Chan, and Harry B. Greenberg. 1989. The Rhesus Rotavirus Outer Capsid Protein VP4 Functions as a Hemagglutinin and is Antigenically Conserved when Expressed by Baculovirus Recombinant. *J. Virol.* 63: 1661-1668.
46. Erich R. Mackow, Robert D. Shaw, Suzanne M. Matsui, Phuoc T. Vo, Minh-Ngoc Dang, and Harry B. Greenberg. 1988. The Rhesus Rotavirus Gene Encoding Protein VP3: Location of Amino Acids Involved Homologous and Heterologous Rotavirus Neutralization and Identification of a Putative Fusion Region. *P.N.A.S.USA* 85: 645-649.
47. J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
48. Suzanne M. Matsui, Erich Mackow, and Harry B. Greenberg. 1989. Molecular Determinant of Rotavirus Neutralization and Protection. *Adv. Virus. Res.* 36: 181-
49. Salete M. C. Newton, William C. Manning, Marianne Howl, and Bruce A. D. Stocker. 1990. Aromatic-Dependent Salmonella with Foreign Epitope Insert in Flagellin as Live Vaccine. *CSH Lab Press. Vaccines* 90: 439-445.
50. Paul A. Offit, Geraldine Blavat, Harry B. Greenberg, and H. Fred. Clark. 1986. Molecular Basis of Rotavirus Virulence: Role of Gene Segment 4. *J. Virol.* 57: 46-49.
51. Paul A. Offit, Robert D. Shaw, and Harry B. Greenberg. 1986. Passive Protection Against Rotavirus-Induced Diarrhea by Monoclonal Antibodies to Surface Proteins VP3 and VP7. *J.Virol.* 58:700-703.

52. Franco M. Ruggeri and Harry B. Greenberg. 1991. Antibodies to the Trypsin Cleavage Peptide VP8 Neutralize Rotavirus by Inhibiting Binding of Virions to Target Cells in Culture. *J.Virol.* 65:2211-2219.
53. Hannut T. Saarilahti, E. Tapio Palva, Jan Holmgren, and Joaquin Sanchez. 1989. Fusion of Genes Encoding Escherichia coli Heat-Stable Enterotoxin and Outer Membrane Protein OmpC. *Infect. Immun.* 57: 3663-3665.
54. Marta Sabara, James E. Gilchrist, G. R. Hudson, and L. A. Babiuk. 1985. Preliminary Characterization of an Epitope Involved in Neutralization and Cell Attachment that is Located on the Major Bovine Rotavirus Glycoprotein. *J.Virol.* 53: 58-66.
55. Joaquin Sanchez, Timothy R. Hirst, and Bernt E. Uhlin. 1988. Hybrid Enterotoxin LTA::StA Proteins and their Protection from Degradation by in vivo Association with B Subunit of Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxin. *Gene.* 64: 265-275.
- 55a. Sanchez J., Johansson S., Löwenadler B., Svennerholm A. M., Holmgren J. 1990. Recombinant cholera toxin B subunit and gene fusion proteins for oral vaccination. *Res. Microbiol.* 141: 971-979.
56. J. Sanchez and J. Holmgren. 1989. Recombinant System for Over-Expression of Cholera Toxin B Subunit in Vibrio cholerae as a Basis for Vaccine Development. *P.N.A.S. USA.* 86: 481-485.
57. Joaquin Sanchez, Jan Holmgren, Ann Mari Svennerholm. 1990. Recombinant Fusion Protein for Simple Detection of Escherichia coli Heat Stable Enterotoxin by GM1-Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2175-2177.
58. J. Sanchez, A.-M. Svennerholm, and J. Holmgren. 1988. Genetic Fusion of a non-Toxic Heat Stable Enterotoxin Related Decapeptide Antigen to Cholera Toxin B Subunit. *FEBS.* 241:110-114.
59. Sandino A. M., M. Jashes, G. Faundez, E. Spencer. 1986. Role of the Inner Protein Capsid on *in vitro* Human Rotavirus Transcription. *J. Virol.* 60:797-802.
60. Mei-Shang Ho, Roger I. Glass, Paul F. Pinsky, Larry J. Anderson. 1988. Rotavirus as a Cause of Diarrheal Morbidity and Mortality in the United States. *J. Infect. Dis.* 158:1112-1116.
61. Robert D. Shaw, Erich R. Mackow, Michael L. Dyall-Smith, Ieva Lazdins, Ian H. Holmes, and Harry B. Greenberg. 1988. Serotypic Analysis of VP3 and VP7 Neutralization Escape

Mutants of Rhesus Rotavirus. *J. Virol.* 62: 3509-3512.

62. Titia K. Sixma, Sylvia E. Pronk, Kor H. Kalk, Ellen S. Wartna, Ben A. M. van Zanten, Bernard Witholt, and Wim G. J. Hol. 1991. Crystal Structure of a Cholera Toxin Related Heat Labile Enterotoxin from E. coli. *Nature* 351: 371-377.
63. Anders Sjölander, Stefan Ståhl, Per-Åke Nygren, Lena Åslund, Niklas Ahlborg, Birgitta Wåhlin, Artur Scherf, Klavs Berzins, Mathias Uhlen, and Peter Perlmann. 1990. Immunogenicity and Antigenicity in Rabbits of a Repeated Sequence of Plasmodium falciparum Antigen Pf155/RESA Fused to two Immunoglobulin G Binding Domains of Staphylococcal Protein A. *Infect. Immun.* 58: 854-859.
64. Hans-Jürgen Streckert, Harald Brüssow, and Hermann Werchau. 1988. A Synthetic Peptide Corresponding to the Cleavage Region of VP3 from Rotavirus SA11 Induces Neutralizing Antibodies. *J. Virol.* 62: 4265-4269.
65. K. Taniguchi, Y. Hoshino, K. Nishikawa, W.L. Maloy, Y. Morita, S. Urasawa, A.Z. Kapikian, R.M. Chanock and M. Gorziglia. 1988. Cross-Reactive and Serotype Specific Neutralization Epitopes on VP7 of Human Rotavirus: Nucleotide Sequence Analysis of Antigenic Mutants Selected with Monoclonal Antibodies. 62: 1870-1874.
66. K. Taniguchi, 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.
67. Koki Taniguchi, Yasuyuki Morita, Tomoko Urasawa, and Shozo Urasawa. 1987. Cross-Reactive Neutralization Epitopes on VP3 of Human Rotavirus: Analysis with Monoclonal Antibodies and Antigenic Variants. *J. Virol.* 61: 1726-1730.
68. B.V. Venkataram Prasad, J. W. Burns, E. Marietta, M. K. Estes, and W. Chiu. 1990. Localization of VP4 Neutralization Sites in Rotavirus by Three-Dimensional Cryo-Electron Microscopy. *Nature*. 343: 476-479.
69. T. Verisaki, A. Z. Kapikian, A. Delem, G. Zissis. 1986. A Comparative Trial of Rhesus Monkey (RRV-1) and Bovine (RIT 4237) Oral Rotavirus Vaccines in Young Children. *J. Infect. Dis.* 153: 832-839.
70. Programme for Control of Diarrhoeal Diseases. World Health Organization. Eighth Programme Report 1990-1991:66-68.