



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR**

**NOROVÍRUS HUMANO GI.4-SYDNEY: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR
E DESENVOLVIMENTO DE CLONE INFECCIOSO E REPLICON**

LAYSSA MIRANDA DE OLIVEIRA PORTELA

Orientador: Tatsuya Nagata
Co-orientador (a): Rosana Blawid

Brasília, 2018



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR**

**NOROVÍRUS HUMANO GII.4-SYDNEY: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR
E DESENVOLVIMENTO DE CLONE INFECCIOSO E REPLICON**

LAYSSA MIRANDA DE OLIVEIRA PORTELA

Orientador: Dr. Tatsuya Nagata
Co (orientadora): Rosana Blawid

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Biologia Molecular, do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Brasília, 2018.

LAYSSA MIRANDA DE OLIVEIRA PORTELA

**NOROVÍRUS HUMANO GII.4-SYDNEY: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR
E DESENVOLVIMENTO DE CLONE INFECCIOSO E REPLICON**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Biologia Molecular, do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Bergmann Ribeiro- UnB
(Presidente)

Prof^a. Dra. Ana Cláudia de Souza- UniCeub
(Membro)

Prof. Dr. Gustavo Barra- UnB
(Membro)

Prof. Dr. Tatsuya Nagata- UnB
(Orientador)

Prof. Dr. Renato Rezende- UnB
(Suplente)

DEDICATÓRIA

*Ao meu Deus, o Senhor da minha vida, o autor de
toda a ciência e sabedoria. Sem Ele nada seria
possível.*

*À minha família especialmente meu marido, Ronaldo
Portela e minha mãe, Gracilene Saraiva.*

AGRADECIMENTOS

O trabalho desenvolvido nessa tese contou com a colaboração de pessoas, que com sua boa vontade disponibilizaram seu tempo, experiência para apoiar esse projeto.

Início os agradecimentos a minha família, em especial minha mãe, Gracilene Saraiva por ser a minha maior incentivadora e ser meu exemplo de uma mulher guerreira e determinada e meu esposo Ronaldo Portela agradeço pelo apoio incondicional, pelo exemplo de fé, integridade, pelos conselhos que não me deixaram desanimar e por sempre acreditar no sucesso dessa pesquisa, mesmo quando tudo dava errado e pelo amor e companherismo ao longo dessa jornada.

Meu agradecimento especial ao meu orientador Tatsuya Nagata por ter se tornado uma referência para mim de humildade, integridade, generosidade e competência. Agradeço pela paciência em me ensinar e até pelas correções que muitas vezes foram duras, mas necessárias. Agradeço por lutar comigo nos momentos mais críticos da minha vida e por muitas vezes assumir um papel de um verdadeiro pai.

A minha co-orientadora e amiga Rosana Blawid, agradeço a oportunidade de conviver com uma profissional e pessoa incrível que sempre nos inspira e nos motiva. Eu sou imensamente grata pelas horas que sempre dedicava para me ensinar e por ter tido a oportunidade de conviver com uma pessoa tão amiga, ética e dedicada.

Aos colegas e amigos do laboratório da Virologia Humana-UnB: Karoline, Elen, Raquel, João, Kenia, Mayra, Dayane, Moana, Raissa, Thiago, Mateus, Ravi, Lizandra, Bruna, Nataly, Leonardo, Lucas, Anelise por toda a amizade, ensinamentos e pelos infidáveis momentos de risadas.

Aos colegas da Virologia Vegetal, Baculovírus, Enzimologia e Microscopia por sempre disponibilizarem o tempo para me ajudar.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo financiamento dessa pesquisa.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia molecular especialmente a coordenação, aos professores por todo o apoio e contribuição no meu aprendizado acadêmico.

MEDITAÇÃO

**“ Não se glorie o sábio na sua sabedoria, nem se glorie o forte na sua força; não se glorie o rico nas suas riquezas;
Mas o que se gloriar, glorie-se nisto: em me conhecer.. diz Senhor ”**

(Jer.9:23 e 24)

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE SIGLAS	VIII
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
INTRODUÇÃO	12
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1.1 Família Caliciviridae	13
1.2 Organização Genômica	15
1.3 Epidemiologia	17
1.4 Epidemiologia molecular de norovírus	19
1.5 Aspectos clínicos e etiológicos	20
1.6 Sistemas modelos	21
1.7 Genética reversa dos calicivirus	29
2. OBJETIVOS	34
2.1 Objetivos Gerais	34
2.2 Objetivos Específicos	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Caracterização molecular e filogenética	35
3.2 Modificação do vetor pcDNA3.1	36
3.3 Construção do cDNA do genoma inteiro	38
3.4 Clonagem dos genes não estruturais Helicase e RdRp	43
4. RESULTADOS	51
4.1 RT-PCR do HuNoV-2012 e clonagem em pCR4-TOPO	51
4.2 Análise filogética das regiões de VP1 e RdRp das variantes do HuNoV GII.4	56
4.3 Montagem do clone infeccioso pHuNoV-Inf e replicon pHuNoV-GFP	58
4.4 Análise da expressão gênica do pHuNoV-Inf e pHuNoV-GFP e detecção da fita do RNA genômico senso negativo por <i>Northern blotting</i>	61
4.5 Confirmação das clonagens dos genes Helicase e RdRp e expressão em células Caco-2	66
5. DISCUSSÃO	72
6. PERSPECTIVA	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
8. APÊNDICE	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A esquerda a estrutura do capsídeo dos calicivirus exemplificada pela reconstrução crio-imagem do recombinante <i>Norwalk virus</i>	14
Figura 2. Representação esquemática da organização genômica dos calicivírus	16
Figura 3. Diagrama representativo da classificação do norovírus dentro da Família <i>Caliciviridae</i> .	16
Figura 4. Agentes etiológicos associados aos surtos de DTA no Brasil entre 2000 e 2014	18
Figura 5. Surtos de gastroenterites de origem alimentar identificados no Brasil no período de 2007-2016	17
Figura 6. Proporções de sinais e sintomas em surtos de DTA no Brasil entre 2007-2017.	20
Figura 7. Um modelo de trabalho para infecção intestinal. Múltiplos estudos demonstram que NoVs se ligam a carboidratos	24
Figura 8. Visão geral do complexo de iniciação da tradução dos Norovirus	25
Figura 9. Mecanismo de síntese do RNA subgenômico. Representação esquemática de dois modelos propostos para a síntese do RNA subgenômico	28
Figura 10. Estrutura genômica do MNV e sistema de genética reversa de baculovírus duplo	31
Figura 11. Modelo proposto para a replicação de PEC mediada pelos ácidos biliares em células LLC-PK	32
Figura 12. Mapa gênico do vetor de expressão pcDNA3.1	37
Figura 13. Representação das modificações realizadas no pcDNA 3.1	40
Figura 14. Estratégia para o desenvolvimento do clone infeccioso e replicon	41
Figura 15. Representação esquemática da reação de recombinação LR	45
Figura 16: Esquema representativo do plasmídeo comercial pENTR 2B	45
Figura 17. Esquema representativo da modificação do pcDNA 3.1/WGF2/FWG2	47
Figura 18. Esquema representativo da modificação do pcDNACWG2/WGC2	48
Figura 19. Representação da reação de recombinação. Entre pENTR-RdRp C/N-term e pcDNA/WGF2/FWG2	49
Figura 20. Representação da reação de recombinação entre pENTR-NTPae C/N term e pcDNA-WGC2/CWG2	50
Figura 21. Eletroforese em gel de agarose 1% com cDNA de HuNoV-393 amplificado por PCR	52
Figura 22. Eletroforese em gel de agarose 1% com cDNA de HuNoV-666 amplificado por PCR	53
Figura 23: Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando perfil de enzimas de restrição dos clones HuNoV-393 em pCR4-3' HuNoV e pCR4-5' HuNoV com Pst I	54
Figura 24: Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando perfil de enzimas de restrição dos clones HuNoV-666 em pCR4-3' HuNoV e pCR4-5' HuNoV com Eco RI e Pst I respectivamente	55
Figura 25. Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica da RdRp do HuNoV GII-4	56
Figura 26. Árvore filogenética baseada na sequência da VP1 do HuNoV GII.4	57
Figura 27. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando perfil de enzima de restrição NdeI do clone infeccioso pHuNoV-Inf	59

Figura 28: Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando perfil de enzima de restrição NdeI do pHuNoV-GFP	60
Figura 29. Microscopia confocal de células transfectadas com pHuNoV-Inf a 48 h.p.t	63
Figura 30. Microscopia confocal de células Caco-2 transfectada com pHuNoV-GFP e d controle pcDNA-GFP	64
Figura 31: Microscopia de confocal do replicon pHuNoV-GFP transfectado em células caco-2 a 48 h.p.t	65
Figura 32. Detecção do fragmento genômico de HuNoV-2012 com as construções pHuNoV-GFP e pHuNoV-Inf em células Caco-2 a 24 e 48 h. p.t	66
Figura 33. Eletroforese em gel de agarose 1%. Clonagem da Helicase N/C-terminal	68
Figura 34. Eletroforese em gel de agarose 1%. Clonagem da RdRp C/N terminal em pENTR 2B	69
Figura 35. Microscopia confocal de células Caco-2 transfectadas com as construções: pcDNA-WGF2 -RdRp-C/N e o controle pcDNA-mGFP	70
Figura 36. Microscopia confocal de células Caco-2 transfectadas com a construção controle: pcDNA-CFP	71

LISTA DE SIGLAS

GA	Gastroenterites agudas
HuNoV	Norovírus humano
ICTV	Comitê internacional de taxonomia
VP1	<i>Major capsid protein</i>
VESV	<i>Vesicular exanthema swine virus</i>
FCV	Calicivírus felino
RHDV	<i>Rabbit hemorrhagic disease virus</i>
EBHSV	<i>European brown hare syndrome virus</i>
SaV	Sapovírus
ORFs	<i>Open reading frames</i>
VF1	Fator de virulência
VP2	<i>Minor capsid protein</i>
VPg	Proteína viral ligada ao genoma
Pro	Protease
RdRp	RNA polymerase dependente de RNA
NoV	Norovírus
CDC	<i>Center of disease control and prevention</i>
DTA	Doenças transmitidas por alimentos
HAV	Hepatite A
HEV	Hepatite E
ADV	Adenovírus
MNV	Norovírus murino
HBGAs	Antígenos do grupo sanguíneo humano
GSL	Glicoesfingolípídeos

PABP	Proteína de ligação a poly (A)
VRC	<i>Viral replication complex</i>
dsRNA	RNA dupla fita
VLPs	<i>Virus like particles</i>
Região S	<i>Shell domain</i>
MVA-T7	Vírus vaccínia expressando a T7 RNA polimerase
cDNA	DNA complementar
FPV-T7	Vírus fowlpox expressando a T7 RNA polimerase
CMV	Promotor eucariótico de citomegalovírus
HDV	Hepatite delta virus
PEC	Calicivírus entéricos suínos
Huh-7	Células de hepatoma humano
pHuNoV-Inf	Clone infeccioso
pHuNoV-GFP	Replicon
h.p.t	Horas pós-transfecção
<i>att</i>	Sítio específico de interação
IHF	Fator de integração do hospedeiro da <i>E.coli</i>
Int	Integrasse no bacteriófago λ
Caco-2	Células de adenocarcinoma colorretal epitelial
CFP	Proteína fluorescente ciano
GFP	Proteína fluorescente verde

RESUMO

Norovírus humano (HuNoV) é uma das principais causas de gastroenterite aguda no mundo sendo responsável por mais de 20% de casos. Esta alta incidência concentrou a atenção para as estratégias de prevenção, especialmente no entendimento da epidemiologia molecular dos norovirus (HuNoV) e para a melhor compreensão dos mecanismos de replicação dos norovirus. Por isso, a genética reversa de HuNoV pode ser uma ferramenta útil para elucidar os processos de infecção viral e mecanismo de replicação. Esse estudo propõe a análise de sequenciamento genômico, desenvolvimento do clone infeccioso e replicon, estudar a localização intracelular da Helicase e RdRp viral. Nesse trabalho foi desenvolvido um método rápido de construção de um clone de cDNA infeccioso de HuNoV usando a técnica *Gibson Assembly*. Dois genomas de dois isolados HuNoV-393 e HuNoV-666 foram clonados em pCR4-Topo e sequenciados. O relacionamento filogenético baseado nos genes da RNA polimerase (RdRP) e capsídeo (VP1) foram comparativamente analisados com as variantes de GII.4. O genoma completo de HuNoV-393 (GII.4 subtipo Sydney) foi clonado no vetor plasmidial pcDNA 3.1 previamente modificado. Para monitorar a replicação viral *in vitro*, o gene repórter da proteína fluorescente verde (GFP) foi fusionado nas posições entre os genes Helicase e p22 também por *Gibson Assembly* para construir o replicon pHuNoV-GFP. As células humanas Caco-2 foram transfectadas com o clone infeccioso contendo cDNA genômico completo e replicon com GFP. A detecção de VP1 em células transfectadas mostraram a evidência indireta da replicação de HuNoV. Desta forma, o clone infeccioso e replicon com GFP para o HuNoV GII.4 subtipo Sydney, constitui uma ferramenta valiosa para o estudo de replicação dos norovírus humano. Nesta tese foi iniciado o estudo dos sítios de replicação do HuNoV por meio do estudo dos genes Helicase e RdRp. Nesse trabalho optamos por clonar os genes Helicase e RdRp em ambas posições N e C-terminal do gene reporter GFP, porém não observamos diferenças de expressão significativa entre as construções RdRp-C e RdRp N-terminal, e com Helicase-N foi observado uma baixa expressão. Experimentos adicionais serão necessários para confirmar a localização das proteínas Helicase e RdRp.

ABSTRACT

Human norovirus (HuNoV) is one of the main cause of acute gastroenteritis worldwide responsible for at least 20% of all cases. The higher incidence payed attention on prevention strategies, especially in understand the molecular epidemiology of norovirus (HuNoV) and for a betther understanding of norovirus replication mechanisms. Therefore, reverse genetics of HuNoV might be a useful tool to elucidate viral infection processes and replication mechanisms. This study proposes the analysis of genomic sequencing, development of the infectious clone and replicon, to study intracellular location of the viral Helicase and RdRp. In this work developed a rapid method constructing an infectious cDNA clone of HuNoV using Gibson Assembly technique. Two genomes of HuNoV GII.4 (HuNoV-393 and HuNoV-666) were cloned into pCR4-Topo and sequenced. The phylogenetic relationship based RdRp and VP1 genes were comparatively analysed with the GII.4 variant. The complete genome of the HuNoV-393 (GII4 subtype Sydney) was cloned into the previously modified pcDNA 3.1. To monitor viral replication *in vitro*, the reporter gene of green fluorescent protein (GFP) was fused at position between Helicase and p22 genes also by Gibson Assembly to construct the pHuNoV-GFP replicon. Human Caco-2 cells were transfected with the full-length genomic clone and replicon with GFP. A detection of VP1 in transfected cells showed the indirect evidence of HuNoV replication. So, the infectious clone and replicon with GFP of HuNoV GII.4 subtype Sydney, is a valuable tools for study in human norovirus replication. In this thesis the study of HuNoV replication sites was started studying the Helicase and RdRp genes. In this work we cloned the Helicase and RdRp genes in both N and C-terminal position of the reporter gene GFP, but we didn't observe significant differences between the RdRp-C and RdRp N-terminal constructs, and the Helicase-N was observed at low expression level. Additional experiments will be need to confirm the location of Helicase and RdRp proteins.

INTRODUÇÃO

O reconhecimento dos vírus como uma entidade biológica foi reconhecido um pouco mais que um século. Entretanto somente no século 20 o entendimento e controle tem sido intensamente explorado (Flint *et al.*, 2008). De fato, os vírus como causador de doenças em humanos tem sido a razão para várias doenças humanas devastadoras como a varíola, febre amarela, poliomielite, influenza, AIDS e mais recentemente a microcefalia causada pelo *Zika virus* (Flint *et al.*, 2008; Wikan and Smith, 2016).

É nesse cenário que as gastroenterites agudas (GA) são inseridas, e se tornaram a segunda causa de morte entre crianças menores de cinco anos sendo responsáveis por cerca de 525 mil mortes anualmente. A GA é causada por uma variedade de patógenos que incluem vírus, bactérias, parasitas, toxinas e drogas (WHO-2009). Os vírus causam uma proporção significativa de doenças entéricas. Dentre estes os principais patógenos virais causadores de gastroenterites em humanos temos: os rotavírus (*Reoviridae*), sapovírus e norovírus (*Caliciviridae*), astrovírus (*Astroviridae*) e adenovírus (*Adenoviridae*). Após a introdução da vacina do rotavírus, houve uma dramática redução de gastroenterites causada por esse patógeno, que abriu espaço ecológico para os norovírus humano (HuNoV) (Yamashita *et al.*, 2001).

As ferramentas de Biologia Molecular estão acumuladas para a pesquisa de HuNoV, visando o seu controle. As pesquisas com HuNoV se inserem em um cenário mundial caracterizado por limitações no cultivo desses vírus em cultura de célula e o que dificulta os estudos para a elucidação dos mecanismos moleculares da replicação viral. As incansáveis tentativas de crescimento em cultura celular têm demonstrado infecção e formação de partículas virais que falham durante a passagem para novas células (Duizer *et al.*, 2004).

Com isso os avanços na compreensão das etapas do processo de infecção viral estão comprometidos, exigindo assim o desenvolvimento de ferramentas que forneçam informações para o estudo da patogênese e também possam contribuir para o desenho de drogas antivirais, que até o momento são inexistentes para HuNoV.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Estudantes e professores pertencentes a uma escola em Norwalk, Ohio em 1968 apresentaram sintomas de gastroenterite aguda. Essa infecção foi inicialmente descrita como doença de vômito no inverno, e provocou um surto epidêmico de vômito e diarreia entre duas e quatro semanas, porém nenhum agente etiológico foi associado a esse episódio (Zahorsky, 1929; Kapikian *et al.*, 1972).

Várias tentativas sem sucesso foram realizadas para identificar o agente etiológico envolvido no surto, porém somente em 1972 Albert Kapikian e colaboradores encontraram partículas em amostras de fezes purificadas purificadas, proveniente de pacientes infectados no surto em Ohio (Kapikian *et al.*, 1972). Por meio da microscopia eletrônica foi possível identificar pequenas partículas virais que se assemelhavam muito com os picornavírus e tornou-se conhecido como *Norwalk virus*. Norovírus se tornou o nome comum do gênero *Norovirus* e o gênero *Norovirus* foi aprovado pelo comitê internacional de taxonomia de vírus (ICTV) (Kapikian *et al.*, 1972).

1.1 Família *Caliciviridae*

A família *Caliciviridae* foi mencionada pela primeira vez no terceiro relatório do ICTV em 1979. A nova família de vírus de RNA senso positivo reunia algumas características únicas que não eram encontradas em outros pequenos vírus de RNA não envelopados de eucariotos (Black *et al.*, 1978).

Dentre essas características, a mais clássica é a maneira como a principal proteína do capsídeo se organiza: como depressões em forma de cálice na superfície do vírion em formato icosaédrico. O nome *Caliciviridae* originou-se do latim *calix*, em referência a forma em cálice que se apresenta o capsídeo (Fig. 1) (Green *et al.*, 2000).

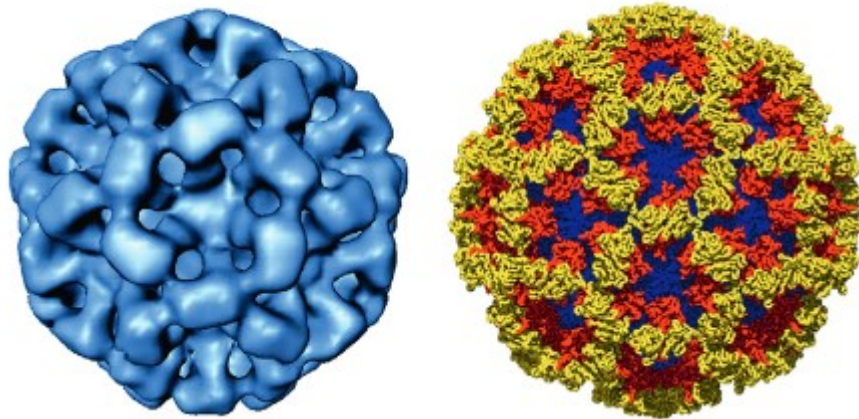


Figura 1: A esquerda a estrutura do capsídeo dos calicivirus exemplificada pela reconstrução crio-imagem do recombinante *Norwalk virus*. A direita a estrutura do capsídeo do *Norwalk virus* por meio de raio-X com os domínios *Shell*, *Protruding 1*, *Protruding 2* coloridos em azul, vermelho e amarelo, respectivamente.(Fonte: King, *et al.*,2012).

Os vírions são não envelopados, possuem simetria icosaédrica e diâmetro de 27-40 nm. Em norovírus, o capsídeo principal, VP1, se organiza em domínios: *Shell* e *Protruding 1* e 2 (Fig. 1) (King *et al.*,2012).

O status taxonômico dos membros pertencentes a família *Caliciviridae* são definidos pelo ICTV e engloba cinco gêneros distintos: *Norovirus*, *Sapovirus*, *Lagovirus*, *Nebovirus* e *Vesivirus* e cada gênero são ainda subdivididos em espécie (Clarke *et al.*, 2012).

Os calicivírus são diversos no que diz respeito a doenças provocadas, o tipo de hospedeiro e as características genéticas, porém possuem em comum, a habilidade de se distribuir globalmente nos seus respectivos hospedeiros. Os vesivírus e lagovírus são importantes patógenos na medicina veterinária (Jiang *et al.*, 2000).

Os vesivírus possuem como reservatório natural os suínos, mamíferos marinhos e felinos. O gênero *Vesivirus* é formado pelo vírus do exantema vesicular dos suínos (*Vesicular exanthema swine virus* – VESV), estirpe protótipo dos calicivírus e provocam lesões vesiculares epiteliais. Também faz parte desse gênero, o calicivírus felino (FCV), reponsável por doenças do trato respiratório superior e ulcerações em gatos (Conley *et al.*, 2017; King *et al.*,2012; Cubitt, 1987; Thumfart, 2002).

Os membros do gênero *Lagovirus* incluem duas espécies: o vírus da doença hemorrágica do coelho (*Rabbit hemorrhagic disease virus* – RHDV) e o vírus da síndrome da lebre marrom européia (*European brown hare syndrome virus* - EBHSV).

As manifestações clínicas em lebres e coelhos são muito semelhantes e podem causar hepatite necrosante conduzindo para hemorragias fatais (Ohlinger *et al.*, 1990).

Os membros do gênero *Sapovirus* e *Norovirus* são considerados os calicivírus de maior importância médica. Os sapovírus (SaV) inicialmente identificado como Sapporro-like virus possuem como hospedeiro humanos e suínos. Os SaV ocorrem especialmente em crianças e se manifesta como uma diarreia moderada (Chiba *et al.*, 2000).

Os norovírus (NoV) possuem como hospedeiros os humanos, bovinos, suínos, ovinos e ratos. Em seres humanos são os patógenos mais comuns nos surtos de gastroenterite de origem não bacteriana. Dentre a população mais suscetível estão os idosos, as crianças e indivíduos imunocomprometidos (Donaldson *et al.*, 2008).

O *Nebovirus* é o gênero mais recente definido para a família *Caliciviridae* e causa doença diarreica endêmica em bezerros e a severidade da doença é considerada igual ou pior causada pelo norovírus bovino genogrupo 3 (King *et al.*, 2012).

1.2 Organização Genômica

Os calicivírus são vírus de RNA senso positivo, possuem genoma fita única, não segmentado que varia de 6.7-8.5 kb. Os vírus de RNA senso positivo possuem o genoma de mesmo sentido codificante que os mRNA eucarióticos e funcionam como molde para a tradução das proteínas virais (Royal e Locker 2016).

Os genomas virais dos calicivírus possuem dois quadros de leitura aberta (*open reading frames*, ORFs) para os membros dos gêneros *Lagovirus*, *Sapovirus* e *Nebovirus* ou três ORFs para os gêneros *Vesivirus* e *Norovirus* (Fig. 2). O norovirus murino possui uma quarta ORF alternativa que sobrepõe-se a região codificante da VP1 e codifica um fator de virulência (VF1), o qual tem sido associado ao antagonismo da resposta imune inata (McFadden *et al.*, 2011; Royal e Locker 2016).

A região 5' do genoma codifica seis proteínas não-estruturais (N-term, Helicase, 3A-like, VPg, Protease e RdRp) e a região 3' codifica as proteínas estruturais: *major capsid protein* VP1 e *minor capsid protein* (VP2), nas quais divergem a localização entre os gêneros (Royal e Locker 2016).

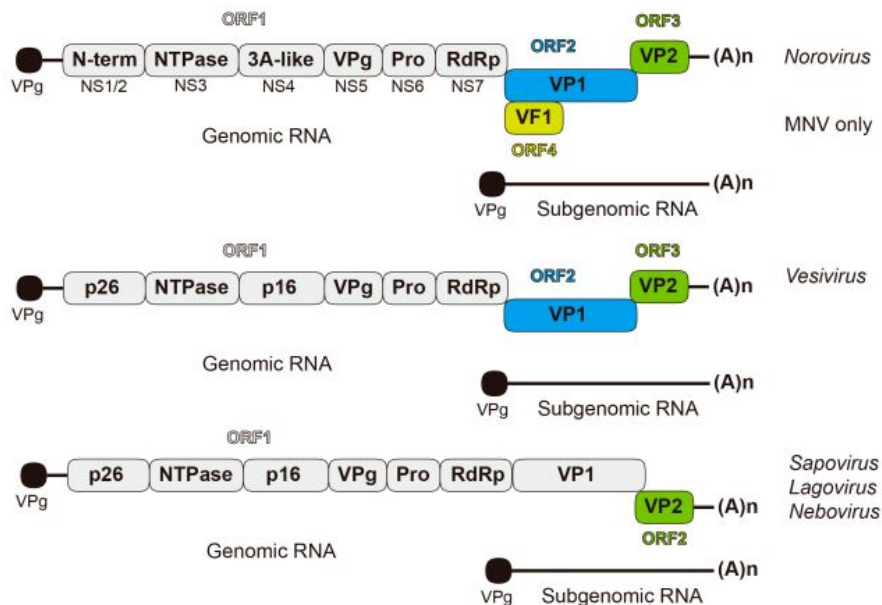


Figura 2: Representação esquemática da organização genômica dos calicivírus. O genoma contém de 2-4 ORFs. VP1 = capsídeo principal, VP2 = capsídeo menor, p26 = Proteína N-terminal, Helicase = Helicase, VPg = Proteína viral ligada ao genoma, p16 = proteína de 16 kDa, Pro = Protease, RdRp = RNA polymerase dependente de RNA. Fonte: Royal e Locker 2016.

Nos gêneros *Lagovirus*, *Sapovirus* e *Nebovirus* as proteínas não estruturais e a VP1 são codificadas pela mesma ORF; enquanto que nos *Vesivirus* e *Norovirus* a VP1 é expressa do RNA subgênomico em ORFs separadas (ORF2) (Fig. 2) (Royal e Locker 2016).

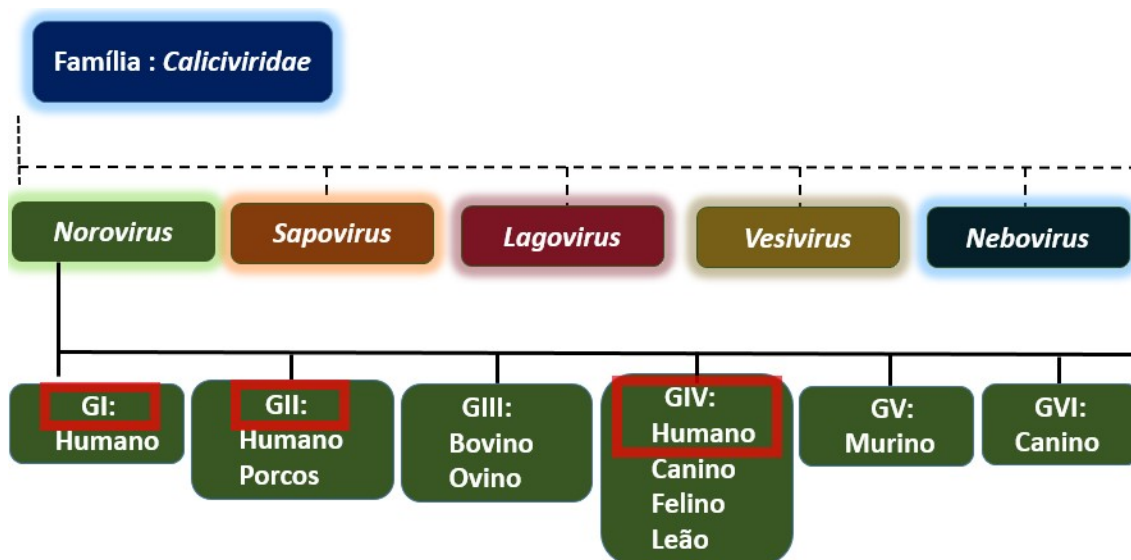


Figura 3: Diagrama representativo da classificação do norovírus dentro da Família *Caliciviridae*. Fonte: Karst *et al.*, 2015.

O gênero mais bem estudado dentro da família é o *Norovirus* (Alhatlani *et al.*, 2015). Os norovírus (NoV) são geneticamente diversos e são divididos em seis genogrupos (GI-GVI) (Fig.3), dentre estes, os mais frequentemente detectados em infecções em humanos são GI, GII e GIV (Parra e Green 2015). Os genogrupos são ainda subdivididos em genótipos baseados na sequência gênica da RdRp e capa proteica (CP) (Thanh *et al.*, 2016).

1.3 Epidemiologia

Os HuNoV infectam pessoas de todas as faixas etária, embora inicialmente acredita-se que a infecção ocorria apenas em crianças em idade escolar e idosos. A infecção ocorre ao longo do ano, porém com maior incidência nos meses frios. Os HuNoV são reconhecidos como os principais agentes causadores de surtos e casos esporádicos de gastroenterite aguda de origem não bacteriana em humanos no mundo (Scallan *et al.*, 2011, Ahmed *et al.*, 2014).

O *Center of disease control and prevention* (CDC) dos Estados Unidos estima que anualmente cerca de 685 milhões de pessoas são acometidos por HuNoV no mundo, dentre estes, 200 milhões estão entre crianças menores de 5 anos de idade o que resulta em 50.000 mortes de crianças/ano (CDC, 2018). No Brasil, o cenário parece que não é muito diferente, porém como o perfil epidemiológico das DTA (Doenças transmitidas por alimentos) são pouco conhecidos por falta de informações estatísticas, as quais somente são disponibilizadas por alguns estados e municípios (Ministério da saúde, 2010).

Mais da metade dos surtos associados a gastroenterites não possuem um agente etiológico definido. A dificuldade de se detectar HuNoV e outros vírus em alimentos está relacionada a complexidade da matriz alimentar e aos baixos níveis de partícula viral o que resulta na subnotificação dos surtos (Dicaprio *et al.*, 2013).

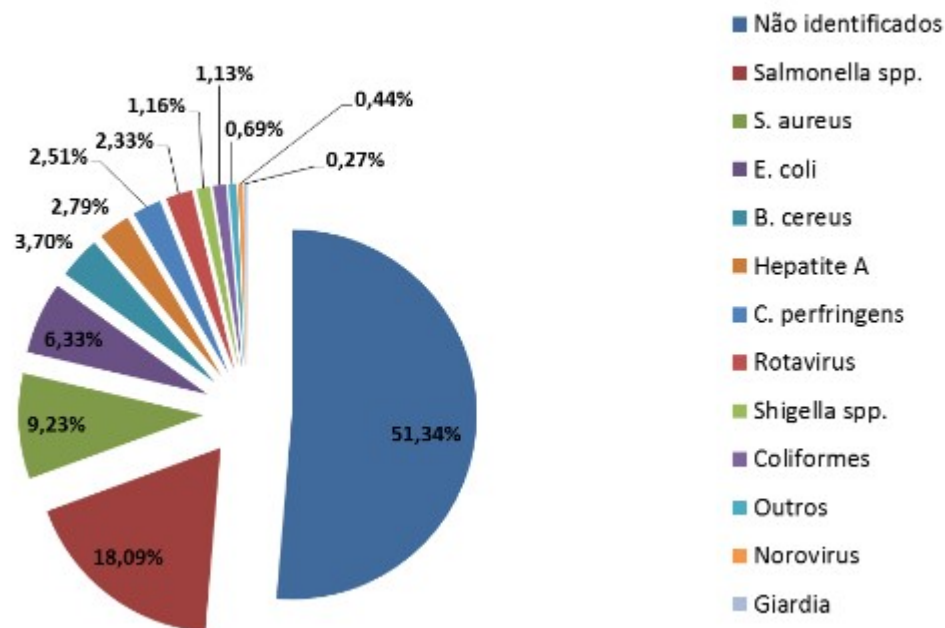
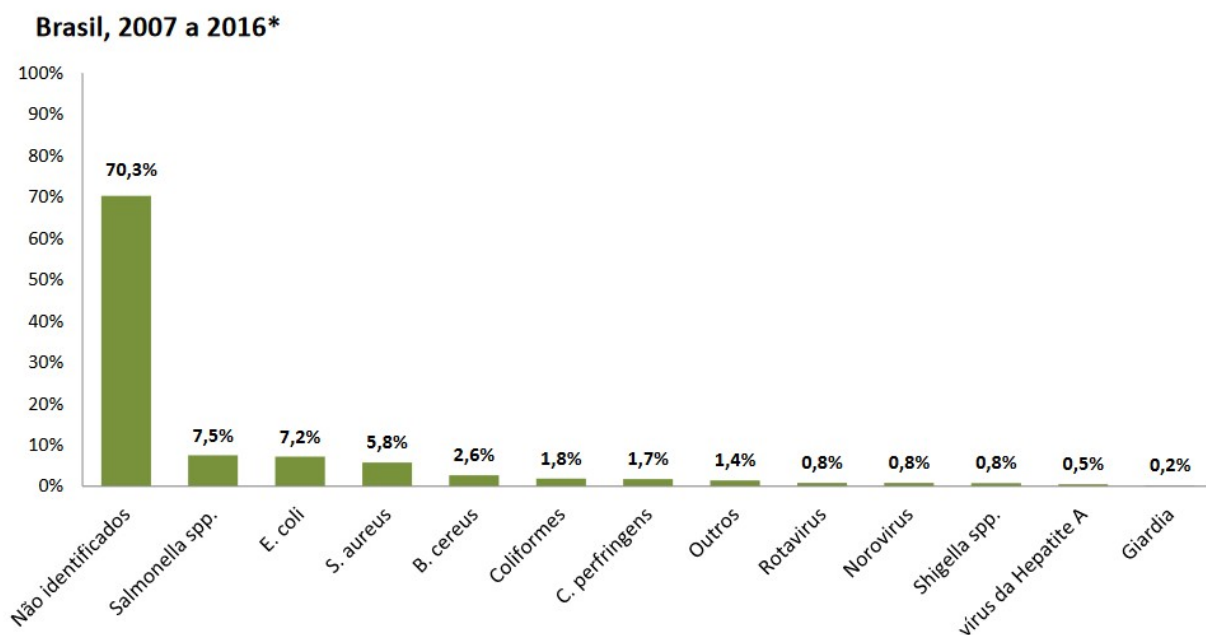


Figura 4: Agentes etiológicos associados aos surtos de DTA no Brasil entre 2000 e 2014. Fonte: Ministério da Saúde, 2017.

No período de 2000-2014, os HuNoV foram associados a 38 surtos de um total de 9719 casos notificados pelo Ministério da Saúde (Fig. 4) e entre o período de 2007-2016 as noroviroses foram atribuídas somente a 0.8% dos casos de gastroenterites (Fig. 5). (Ministério da Saúde, 2017)



*Dados sujeitos a atualização

Figura 5: Surtos de gastroenterites de origem alimentar identificados no Brasil no período de 2007-2016.

As redes de vigilância epidemiológica como Noronet (Holanda), Calicinet e National outbreak reporting system (Estados Unidos) e Food-borne viruses in Europe (União Europeia), tem auxiliado no compartilhamento de dados epidemiológicos e moleculares de surtos, e tem facilitado o acesso a informações sobre os genótipos circulantes e o surgimento de novas variantes (Ahmed *et al.*, 2014).

1.4 Epidemiologia molecular de norovírus

Os surtos epidêmicos de norovírus até então registrado tem demonstrado a predominância dos genótipos pertencentes ao GII e muitos deles pertencem ao GII.4, GII.3, GII.6, GII.8 e GII.17. A diversidade gênica entre os genótipos tem resultado na emergência de muitos recombinantes e conseqüentemente na introdução de novas variantes antigênicas (Thanh *et al.*, 2016).

A frequência com que essas variantes de norovírus circulam contribui para o aumento do número de infecções sequenciais com estirpes distintas, sugerindo ausência de proteção cruzada entre os genótipos (Parra e Green 2015).

Desde a década de 90 o genótipo GII.4 é o genótipo globalmente predominante e tem sido associado aos principais surtos por gastroenterite de origem viral (Alhatlani *et al.*, 2015). Este genótipo sofre constantes variações genéticas o que resultam no surgimento periódicos de novas variantes que substituem a circulação de variantes anteriores. A primeira variante descrita US/95/96 foi responsável por 55% dos surtos de HuNoV nos EUA entre 1995-1996 e em 2002, foi substituída pela variante Farmington Hills (Vinje *et al.*, 1997; Widdowson *et al.*, 2004). Dois anos depois, a variante Hunter foi detectada na Austrália, Europa e Ásia (Bull *et al.* 2006). Esta variante em 2006 foi substituída por duas novas variantes (Laurens 2006a e Minerva 2006b) que co-circulavam nos EUA e Europa (Kroneman *et al.*, 2006; Siebenga *et al.*, 2008).

Em 2012, uma nova variante do GII.4 foi reportada circulando em Sydney, HuNoV GII.4-2012, e desde então, tem causado um aumento dos níveis de ocorrência de HuNoV globalmente. Entretanto, tem sido reportado a circulação de um novo genótipo, GII.17. No Brasil, o genótipo GII.17 foi detectado no período de 2005 e 2009, no norte do país e tem sido descrito como uma nova variante recombinante com a ORF 1 do genótipo GII.13 (Fumian *et al.*, 2016).

O sistema atual de genotipagem tem sofrido com algumas confusões com a nomenclatura dos genótipos. A classificação dos HuNoV baseada nas sequências gênicas da ORF1 (RdRp) e ORF2 (VP1) pode variar devido aos frequentes eventos de recombinação na junção da ORF1 e ORF2 e a genotipagem usando apenas umas das ORFs poderia não mostrar uma reflexão verdadeira do genótipo viral (Kroneman *et al.*,2013).

Kroneman e colaboradores (2013) propuseram um sistema de classificação para evitar a confusão com os nomes dos genótipos. Para determinar o genótipo deveria ser incluído um “P” que designa polimerase (RdRp) para os genótipos que se baseiam na determinação da sequência da polimerase, como exemplo GII.P4 e para os que se baseiam na sequência da VP1 seriam nomeados como GII.4 (Kroneman *et al.*, 2013).

1.5 Aspectos clínicos e etiológicos

Doença transmitida por alimento se refere a uma síndrome constituída por anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia acompanhada ou não de febre, relacionado a ingestão de água ou alimentos contaminados que podem ser causados por toxinas (produzidas por bactérias), bactérias, vírus, parasitas, príons e substâncias tóxicas (Fig. 6) (Ministério da Saúde-2005).

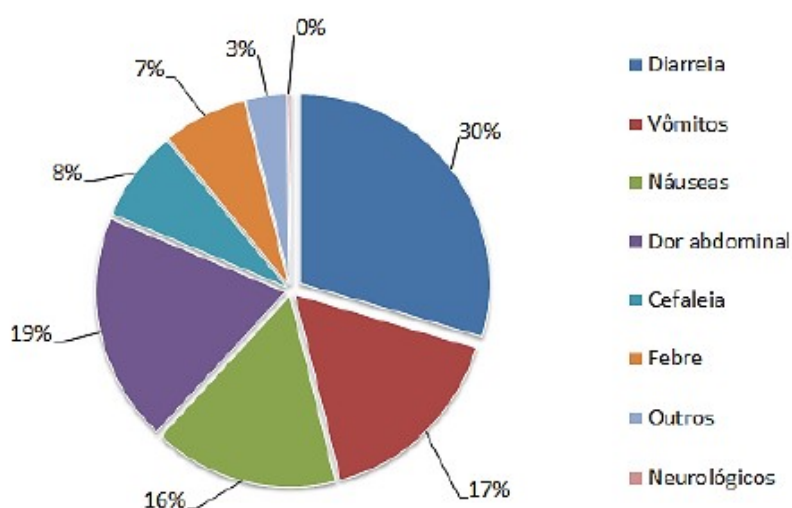


Figura 6: Proporções de sinais e sintomas em surtos de DTA no Brasil entre 2007-2017. Fonte: Sinan/SVS.

Os vírus entéricos como o Hepatite A (HAV) e E (HEV), norovírus, enterovírus, astrovírus, parvovírus, rotavírus, adenovírus (ADV) e menos frequentemente os coronavírus são importantes patógenos que contaminam água/alimentos (Hennechart *et al.*, 2015). Nos últimos anos as norovirose tem causado uma epidemia mundial de gastroenterite aguda, frequentemente estão associados a surtos em comunidade semi-fechada como cruzeiros marítimos, hospitais, lares de idosos e afetam pessoas de todas as idades (Jiang *et al.*, 1993).

A facilidade que os norovírus encontram para provocar tais surtos epidêmicos é o resultado da propensa combinação de alguns fatores como: alto nível de propagação, elevada persistência ambiental, longos períodos de propagação assintomática, mesmo após a resolução da clínica, alta variabilidade gênica e antigênica e período de imunidade humoral a curto prazo (Hansman *et al.*, 2006).

O curso da infecção de HuNoV é rápido e são descritas como autolimitadas, possuem período de incubação que duram de 12-72 horas. Os sintomas podem durar de 1-3 dias (Lopman *et al.*, 2004). O sintoma mais reportado é a diarreia, seguido por vômito, dores abdominais, cólicas, náuseas e febre (Pybus *et al.*, 2007).

Embora a infecção por HuNoV possua um quadro evolutivo que se resolve dentro de dias, para determinados grupos de risco, a doença induzida por HuNoV pode ser mais severa e prolongada. Um exemplo disso, são crianças pequenas que podem prolongar os sintomas até seis semanas (Kirkwood e Streitberg, 2008). A infecção sintomática prolongada também tem sido documentada em pacientes transplantados e indivíduos imunocomprometidos com duração dos sintomas superior a dois anos e tem se agravado em idosos resultando em morte (Morotti *et al.*, 2004).

A morbidade mais assertiva para as infecções induzidas por HuNoV tem sido impossibilitada devido a detecção dificultada, pois estes vírus não podem ser propagados em cultura celular e são geneticamente diversos para serem detectados por RT-PCR (Koopmans, 2008).

1.6 Sistemas modelos

Devido a limitação de cultivo dos HuNoV em células, as informações sobre o ciclo de replicação viral são parcialmente inferidas com base no estudo de outros

calicivírus animais, para os quais já estão disponíveis sistemas para a propagação viral (Vashist *et al.*, 2009).

Tropismo celular

A determinação do tropismo celular dos HuNoV tem sido intensamente debatida pela comunidade científica. A primeira tentativa bem-sucedida de se cultivar um norovírus foi realizada para norovírus murino (MNV) em macrófagos murinos e células dendríticas e posteriormente um tropismo adicional de MNV para células B murino (Wobus *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2014).

Apesar de várias tentativas sem sucesso de se cultivar HuNoV em macrófagos derivado de células sanguíneas e células dendríticas, recentes avanços começaram a superar este desafio e revelaram que algumas linhagens humanas de células B (BJAB, RAJI, Namalwa) são suscetíveis a infecção com HuNoV GII.4-2012 (Jones *et al.*, 2014).

Outro sistema alternativo de infecção *in vitro* que tem sido proposto é o cultivo de HuNoV em células epiteliais intestinais, no entanto várias tentativas de cultivar HuNoV sem sucesso sugeriram que as linhagens de células epiteliais intestinais não são suscetíveis a replicação viral (Duizer *et al.*, 2004; Takanashi *et al.* 2014; Papafragkou *et al.*, 2013, Herbst-Kralovetz *et al.*, 2013).

Contrariando esses resultados, um recente avanço descreveu o uso de enteróides intestinais no cultivo de HuNoV (Ettayebi *et al.*, 2016). O cultivo de enteróides provenientes do duodeno, jejuno ou íleo somente permitiu a infecção quando as células foram maturadas em monocamadas e diferentemente da BJAB exibiram efeito citopático (Ettayebi *et al.*, 2016).

Estudos comparativos entre o sistema de infecção em células imunes e células epiteliais intestinais utilizando o mesmo estoque viral são necessários para determinar se um sistema permite mais a replicação do que outro. A vantagem da utilização do sistema de infecção em células imunes reside na facilidade e simplicidade de uso, entretanto se faz necessário superar as variações vista entre os laboratórios (Jones *et al.*, 2015).

Mecanismo de ligação e entrada dos norovírus

Em geral, a infecção viral é um processo coordenado por uma sequência de múltiplas etapas que se inicia com a ligação das partículas virais aos receptores celulares e resulta em mudanças conformacionais do capsídeo, ativação da sinalização celular e endocitose. Baseando-se nisso supõe-se que o processo de entrada dos norovírus siga mecanismos semelhantes (Mercer *et al.*, 2010).

Assim como as células sanguíneas, as células epiteliais intestinais também carregam carboidratos na superfície. Esses carboidratos são oficialmente conhecidos como antígenos do grupo sanguíneo humano, ou HBGAs (Vashist *et al.*, 2009) e algumas bactérias comensais possuem carboidratos mimetizando estes antígenos.

Algumas pesquisas têm correlacionado a presença desses carboidratos expressos em bactérias ou livres, ao estímulo da infecção por HuNoV. A primeira evidência que comprovou essa correlação foi revelada após a infecção de HuNoV em células B ser facilitada por bactérias comensais. A filtração dessas bactérias de amostras de fezes HuNoV positiva resultou na redução da infecção viral de células B e após a incubação de bactérias comensais que expressavam o HBGA a infecção foi restabelecida (Jones *et al.*, 2014; Karst *et al.*, 2015).

Em síntese, de acordo com o modelo de infecção proposto, os HuNoV se ligam a carboidratos que são expressos nos enterócitos ou por bactérias. Os HuNoV podem atravessar barreira epitelial via células M (*microfold cells*), ou por meio dos enterócitos que expressam o HBGA. As células M são células especializadas do epitélio intestinal e são altamente eficientes na amostragem e no transporte do material luminal. Alguns patógenos se utilizam dessa propriedade como um meio para violar o epitélio intestinal e algumas evidências tem sugerido que os HuNoV utilizam mecanismos similares para atravessar a barreira epitelial intestinal (Mabbott *et al.*, 2013). Ao atravessar a barreira intestinal os HuNoV infectam células dendríticas, macrófagos e células B (Fig. 7) (Karst *et al.*, 2015).

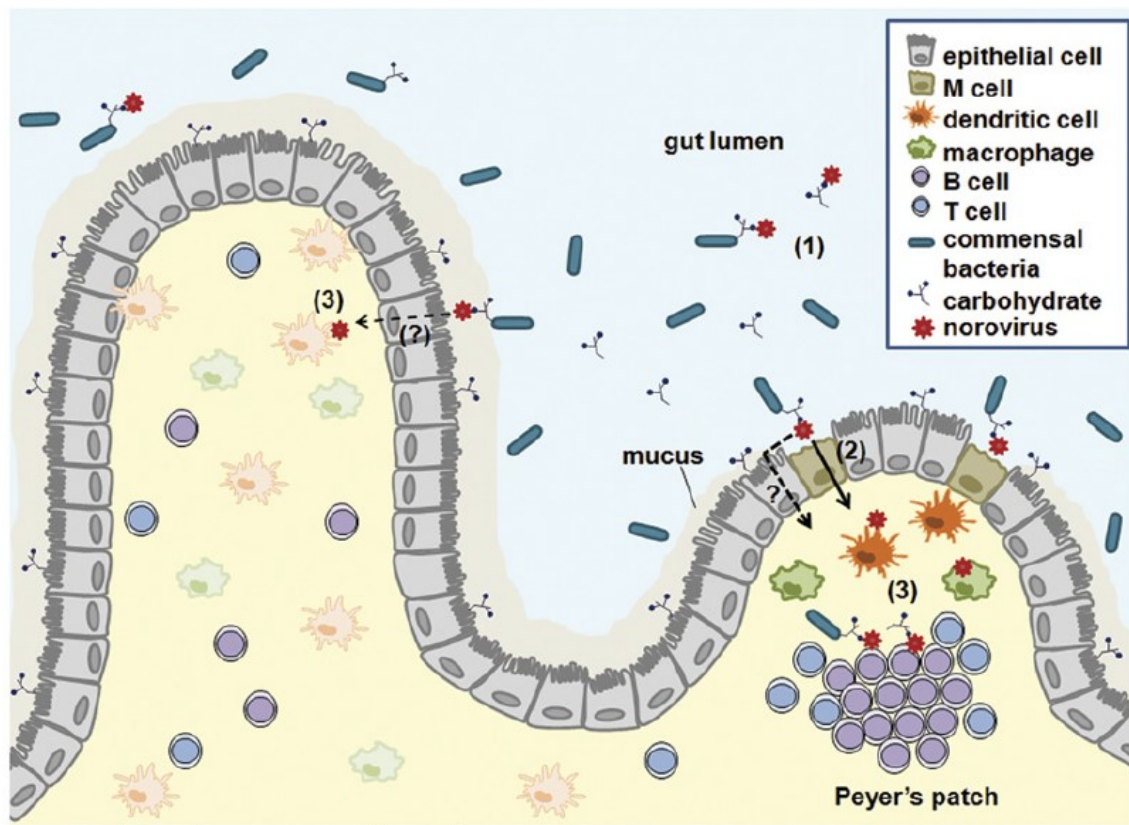


Figura 7: Um modelo de trabalho para infecção intestinal. Múltiplos estudos demonstram que NoVs se ligam a carboidratos. Estes carboidratos são expressos nos enterócitos e secretados dentro do lúmen intestinal. Além disso, bactérias entéricas podem expressar carboidratos similares. Os NoVs podem se ligar a tais carboidratos em algum destes contextos (1). NoVs então atravessam o epitélio intestinal via células M (2) e vias adicionais como já identificado. Seguindo a transcitose os NoV infectam células dendríticas, macrófagos e células B (3). Dependendo da espécie, a infecção pode ocorrer na presença ou ausência de carboidratos. Carboidratos livres ou expresso nas bactérias podem ser cotransitados com o vírus. A infecção das células imunes e apresentação concomitante do antígeno viral e bacteriano durante a infecção podem ter consequências significantes na natureza e magnitude da resposta imune viral. Fonte: Karst *et al.*, 2015 com modificações).

Outros estudos têm investigado lipídeos ligados ao HBGA, como exemplo os glicosíngolipídeos (GSL), os quais são constituintes da membrana plasmática de muitas células. A ceramida desempenha um papel essencial na ancoragem dos GSL na membrana e também participa da endocitose dos MNV acompanhado da dinamina II e colesterol (Taube, 2010). É possível que assim como os MNV os HuNoV entrem na célula dependente da ceramida e colesterol (Perry *et al.*, 2009; Perry e Wobus, 2010; Shivanna *et al.*, 2015).

Eventos de biossíntese viral

A tradução das proteínas virais se inicia com a liberação do genoma dos norovírus no citoplasma das células hospedeiras, o qual atua como um mRNA molde para direcionar a primeira etapa da tradução do RNA viral. A condição para esta etapa acontecer é o RNA viral ser reconhecido pelos fatores de iniciação da tradução celular e traduzido pela maquinaria de tradução (Firth e Brierley, 2012).

Ao contrário dos mRNA das células hospedeiras que possuem uma estrutura *cap* no terminal 5', o genoma dos calicivírus é covalentemente ligado a uma proteína viral, VPg, que atua no recrutamento dos fatores de iniciação da tradução (Chaudhry *et al.*, 2006; Guix *et al.*, 2007).

A VPg de HuNoV e MNV tem sido reportada por possuir interações com componentes do complexo dos fatores de iniciação da tradução do eIF4F, mais especificamente o eIF4E (Fig. 8) (Chaudhry *et al.*, 2006; Goodfellow *et al.*, 2005).

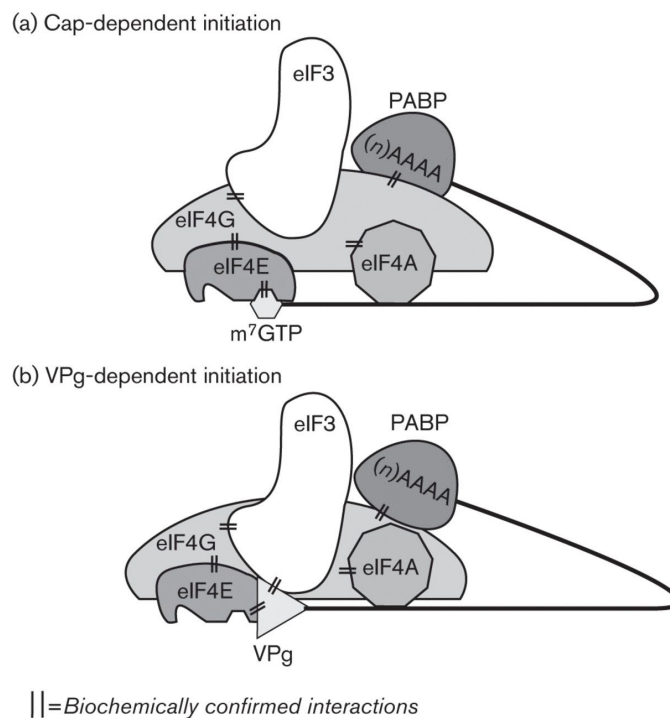


Figura 8: Visão geral do complexo de iniciação da tradução dos Norovírus. A) Representação esquemática do complexo formado entre o fator de iniciação da tradução celular eIF4F cap-dependente e o terminal 5' do mRNA celular. A interação do eIF4E proteína ligante de cap com a estrutura cap metilada recruta o eIF4G. A ligação do eIF4G ao eIF4E também permite o recrutamento do componente eIF4A da helicase do RNA e o complexo eIF3. eIF3 é responsável posteriormente para o recrutamento da subunidade ribossomal menor 40S antes da iniciação da tradução. B) A tradução dependente de VPg dos Norovírus também exige uma interação entre VPg e fatores de iniciação da tradução. Até o momento

somente interações diretas com eIF4E e eIF3 tem sido documentada. As interações estabelecidas são bioquimicamente indicadas. Fonte: Thorne e Goodfellow 2013 com modificações.

Os terminais 5' e 3' dos HuNoV contém estruturas de RNA conservadas e foram sugeridas interações com proteínas celulares como a proteína de ligação a poly (A) (PABP). O papel desempenhado por essas interações está relacionado a tradução e replicação viral e já tem sido elucidado para os MNV e para outros vírus de RNA (Gutierrez *et al.*, 2000, Vashist *et al.*, 2012).

A estratégia bastante utilizada pelos norovírus é a utilização do RNA subgenômico para síntese das proteínas estruturais VP1 e VP2 com o objetivo de produzir níveis mais altos da principal proteína do capsídeo. Já a tradução da VP2 ocorre pelo mecanismo de terminação-reiniciação, os ribossomos nesse caso permanecem associados com o RNA para reiniciar no início da ORF3 (VP2) (Prasad *et al.*, 1994; Naphthine *et al.*, 2009).

Assim como os vírus de RNA senso positivo, é sugerido que a replicação dos norovírus ocorre em associação a membranas intracelulares (Belov *et al.*, 2012; Wobus *et al.*, 2004). Os membros pertencentes a esse grupo se replicam no citoplasma através de um RNA senso negativo intermediário. Algumas proteínas não-estruturais dirigem o genoma viral a montagem do complexo de replicação de RNA. Para a montagem desses complexos acontecerem é necessário o envolvimento de interações entre genoma e proteína viral e fatores hospedeiros o que resulta no rearranjo das membranas celulares das células infectadas o que fornece um ambiente propício para replicação do genoma (Villanueva *et al.*, 2005). Dentro desses complexos, a replicação genômica é direcionada por proteínas virais essenciais como helicase e polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp). A forte interação entre essas proteínas virais com proteínas de membrana do hospedeiro é essencial para a realização da replicação viral. A replicação ocorre nestes complexos (*viral replication complex*, VRC) para driblar os mecanismos de silenciamento gênico (ou RNA interferente) da célula hospedeira, que são desencadeados pela formação de moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) (Zamore *et al.*, 2000). Estudos recentes demonstraram a primeira evidência experimental de que as proteínas não estruturais p48, helicase e p22 são os principais dirigentes na formação dos VRCs do HuNoV GII.4 (Doerflinger *et al.*, 2017).

Muitos vírus de RNA se utilizam do mecanismo *de novo* ou primer-independente para iniciar replicação. Esse mecanismo se inicia com uma cadeia de

RNA, geralmente com uma purina nucleosídeo trifosfato o qual possui como molde uma pirimidina no terminal 3' da fita molde (Paul *et al.*, 2015).

Tem sido considerado que o RNA genômico pode ser sintetizado utilizando a maneira dependente de VPg. Para este processo acontecer é necessário que a NS7/RdRp utilize a VPg como *primer* para a síntese do RNA, o qual é iniciado do terminal 3' do RNA senso negativo (Chaudhry *et al.*, 2006).

Alguns calicivírus e outros membros da família *Picornaviridae*, também utilizam esse mesmo mecanismo para sintetizar o RNA genômico (Chaudhry *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009, Rohayem *et al.*, 2006). Este processo referido como nucleotidilação ou guanilação começa quando a RdRp inicia a síntese do RNA por covalentemente anexar a VPg por ponte fosfodiéster no primeiro nucleotídeo, o que invariavelmente é uma guanina para os membros da família *Caliciviridae* (Subba-Reddy *et al.*, 2011). A presença da VPg é essencial e sua remoção resulta em uma diminuição significativa da infectividade viral (Chaudhry *et al.*, 2006; Guix *et al.*, 2007).

Para o mecanismo de síntese do RNA subgenômico de norovírus tem sido apresentado dois modelos (Fig. 9). No primeiro modelo, durante a síntese do RNA genômico senso negativo, ocorre uma terminação prematura devido a presença de um sinal de terminação (grampo) e resulta no RNA subgenômico senso negativo, o qual serve como molde para a produção do RNA subgenômico senso positivo. No segundo modelo, uma estrutura secundária localizada *downstream* da ORF2 no RNA genômico senso negativo completo, atua como um promotor para síntese do RNA subgenômico senso positivo (Simmonds *et al.*, 2008).

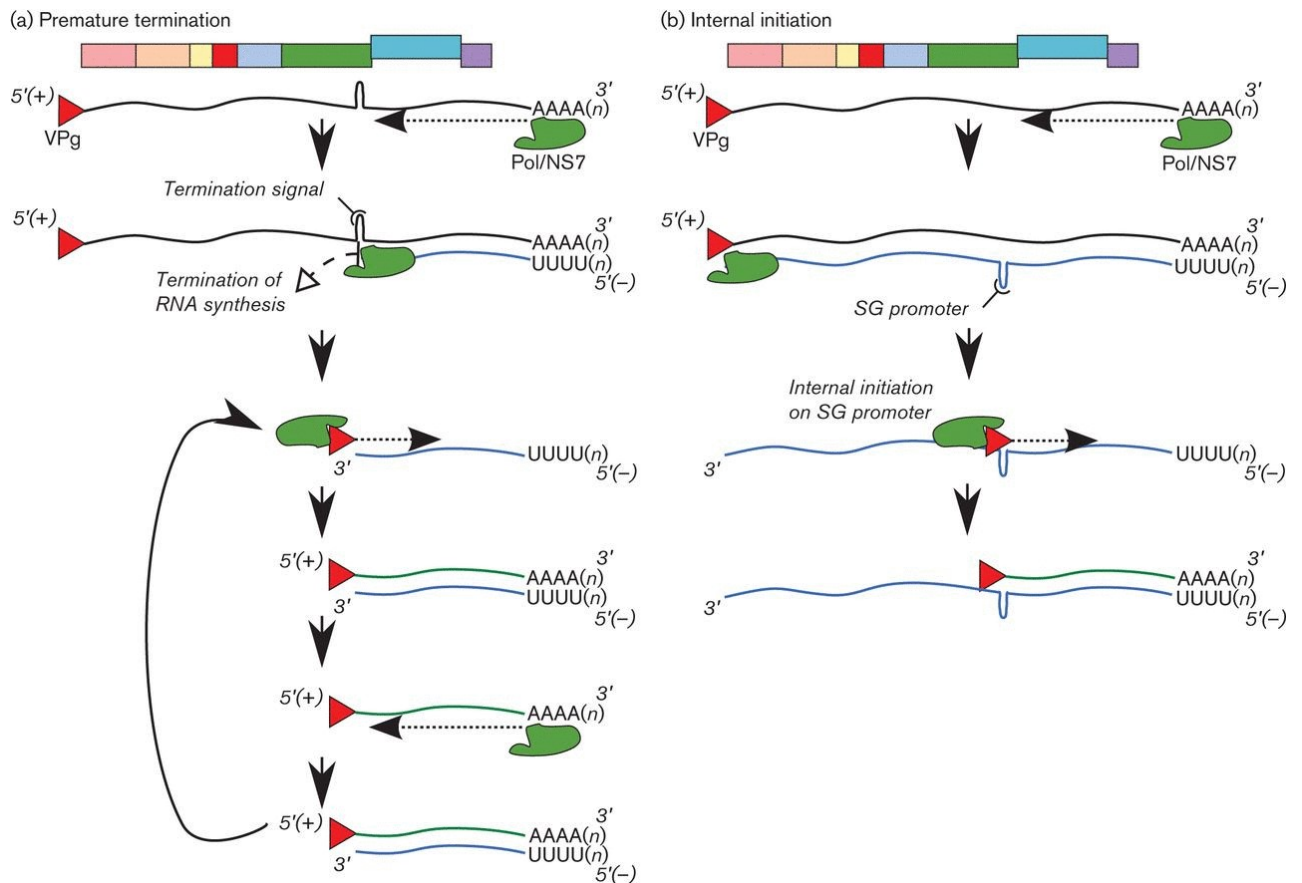


Figura 9: Mecanismo de síntese do RNA subgenômico. Representação esquemática de dois modelos propostos para a síntese do RNA subgenômico. (A) A presença de um sinal de terminação *upstream* da região codificante VP1 (sinal de terminação) resulta na terminação prematura durante a síntese do RNA senso negativo pela RNA polimerase viral (NS7/Pol). A VPg ligada ao RNA molde senso positivo é desenhado em vermelho e a iniciação ocorre *de novo*. O RNA subgenômico de senso negativo (azul) resultante é então usado para a síntese do RNA dependente de VPg para produzir um dsRNA subgenômico. O RNA subgenômico filho recém-sintetizado (verde) pode ser usado como molde para a síntese do RNA subgenômico senso negativo. Este por sua vez atua como molde para rodadas adicionais da síntese do RNA subgenômico filho. (B) Modelos de iniciação interno depende da síntese do RNA subgenômico VPg-dependente que ocorre em uma sequência promotora presente *downstream* da região codificante VP1 no RNA de senso negativo (Azul, promotor SG). A polimerase viral inicia a síntese do RNA, presumivelmente de uma maneira que depende de VPg, para produzir um novo RNA subgenômico filho ligado a VPg (vermelho), que pode, por sua vez, atuar como modelo para rodadas adicionais de síntese do RNA subgenômico como mostrado no modelo de terminação prematura. Fonte: Thorne e Goodfellow 2013 com modificações

Montagem e saída

O mecanismo de montagem e saída dos norovírus não são completamente compreendidos. A VP1 dos norovírus é capaz de se auto montar e produzir VLPs (*Virus like particles*), as quais são morfológicamente idênticas do vírion nativo, por essa razão, é sugerida ser suficiente para dirigir a montagem do capsídeo (Bertolotti *et al.*, 2002).

Já a VP2, apesar de não ser exigida para a montagem da VLP, possui um papel essencial na estabilidade de VP1 e tem sido especulado estar envolvida no processo de encapsidação. Alguns estudos bioquímicos tem demonstrado que a VP2 interage com a VP1 por meio de um motivo conservado localizado na região S (*shell domain*) da VP1 (Sosnovtsev *et al.*, 2005; Vongpunsawad *et al.* 2013).

1.7 Genética reversa dos calicivirus

O termo genética reversa define a habilidade de manipular um RNA viral através do seu DNA complementar. Esse método é o resultado das primeiras aplicações da tecnologia do DNA recombinante (desenvolvido por Cohen e Boyer em 1973), o qual, acompanhado pela descoberta da transcriptase reversa (por Temin e Baltimore 1970), tornou possível produzir vírus recombinantes, analisar a ligação entre o genótipo e fenótipo e dissecar os aspectos do ciclo de vida viral (Cohen 1973, Temin 1970, Baltimore, 1970).

Os primeiros sistemas de genética reversa para vírus de RNA senso positivo foram desenvolvidos em 1978 para o genoma de RNA do bacteriófago QB e em 1980 para o poliovírus o qual foi inserido em células de mamífero e resultou na produção de vírus infecciosos (Tanigushi *et al.*, 1978, Racaniello e Baltimore 1981).

SISTEMAS DE GENÉTICA REVERSA

Norovirus murino (MNV)

O MNV foi o primeiro norovírus a ter o sistema de genética reversa (clone infeccioso) desenvolvido. A partir desse estudo, várias estratégias de genética reversa que incluem sistema de transcrição *in vitro* ou vírus *helper* dependente foram descritos para várias estirpes de MNV (Chaudhry *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2007; Arias *et al.*, 2012, Strong *et al.*, 2012, Sandoval-Jaime *et al.*, 2015).

As primeiras tentativas utilizando o sistema de transcrição *in vitro* e MVA-T7 (vírus Vaccínia expressando a T7 RNA polimerase) falharam em razão da ineficiência da transfecção e também possivelmente devido a replicação simultânea do vetor de vírus Vaccínia -T7 (Chaundy *et al.*, 2007). Alguns estudos indicaram que os sequestros dos fatores de iniciação da tradução do hospedeiro são recrutados para o citoplasma durante a replicação do vírus Vaccínia, o que pode ter contribuído para a inibição da replicação dos MNV (Katsafanas e Moss, 2007).

Os obstáculos encontrados para o estabelecimento de um sistema de genética reversa para MNV só foram superados quando o cDNA do MNV foi transfectado em células de mamífero previamente infectada com o vírus Fowlpox expressando a T7 polimerase (FPV-T7). Essa mesma abordagem também foi aplicada para células permissivas para MNV, entretanto não foi bem-sucedida, devido a baixa taxa de transfecção e ineficiente infecção do FPV-T7 na linhagem celular RAW264.7 (Chaundy *et al.*, 2007).

Outra abordagem alternativa é fundamentada em um sistema de transdução baseado em dois componentes de baculovírus, o qual se resume em um baculovírus que contém um clone de cDNA sob o controle do promotor para RNA polimerase II induzível por tetraciclina e outro baculovírus que expressa um transativador da tetraciclina (Fig. 10). Mais tarde esse sistema foi substituído por outro mais simplificado que transfecta diretamente a célula 293T com um único plasmídeo contendo o cDNA viral sob o controle de um promotor eucariótico de citomegalovirus (CMV) (Ward *et al.*, 2007).

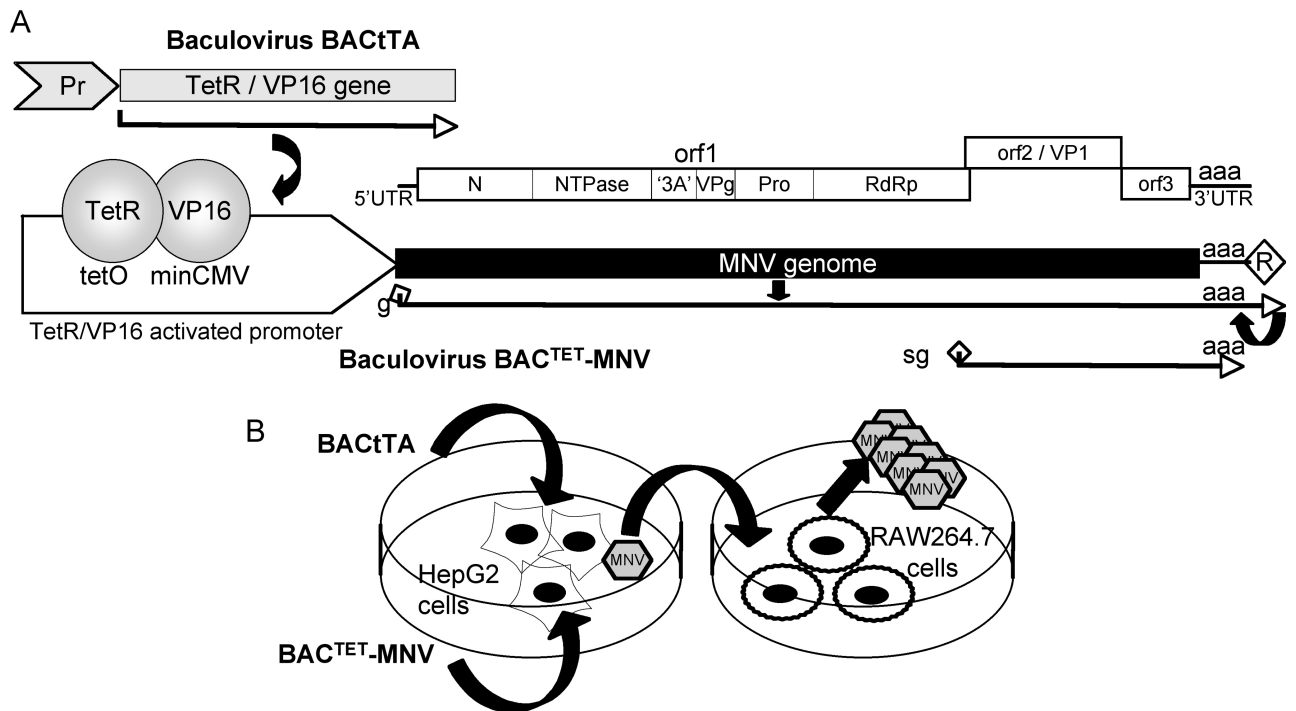


Figura 10: Estrutura genômica do MNV e sistema de genética reversa de baculovírus duplo. (A) Esquema da estrutura do genoma do MNV mostrando a poliproteína ORF1: N-term (N), Helicase, 3A-like (3A), VPg, protease (Pro) e RNA dependente de RNA polimerase (RdRp); ORF2 codificando a principal proteína do capsídeo (VP1); e ORF3. O terminal 5' e 3' UTR, incluindo a cauda de poly-A, são indicados. O sistema de baculovírus duplo compreende um vírus BACtTA que codifica uma proteína repressora Tet (TetR) a qual é fusionada a um transativador VP16. A expressão de um promotor de mamífero dirige a expressão e ligação do domínio TetR a sequência do operador Tet (TetO) e transativação do promotor CMV pela VP16 no genoma do segundo baculovírus BACTET-MNV. O cDNA genômico do MNV, a cauda de poly-A e a ribozima HDV são transcritos com a clivagem da ribozima gerando um RNA genômico com cauda de poly-A. é pensado que a replicação do MNV gera um RNA subgenômico do qual a VP1 é expressa. O RNA genômico e subgenômico e acoplado a VPg. (B) Sistema de transdução e recuperação que mostra a co-transdução de células HepG2 com o baculovírus BACtTA e BACTET-MNV, seguido por recuperação e amplificação do MNV recombinante em células RAW 264.7. Fonte: Ward 2007 com modificações.

Calicivírus entéricos suínos (PEC)

O primeiro sistema de genética reversa do calicivírus entéricos suínos (PEC) foi inicialmente descrito em 2005 (Chang *et al.*, 2005) e utilizou a abordagem de transfectar o RNA transcrito *in vitro* e capeado em células permissivas, no entanto o sucesso da replicação dependia da adição de ácidos biliares do porco gnotobiótico (Flynn *et al.*, 1988).

O efeito dos ácidos biliares na infecção dos PEC mostrou ser mais críticos durante o estágio inicial da replicação viral, não sendo exigido nas etapas subsequentes a liberação do genoma viral no citoplasma (Fig. 11) (Shivanna *et al.*, 2014).

Os ácidos biliares também já foram reportados terem um papel significante na replicação de alguns vírus como da Hepatite B e C (Chang e George 2007, Chhatwal *et al.*, 2012, Kim *et al.*, 2010, Scholtes *et al.*, 2008).

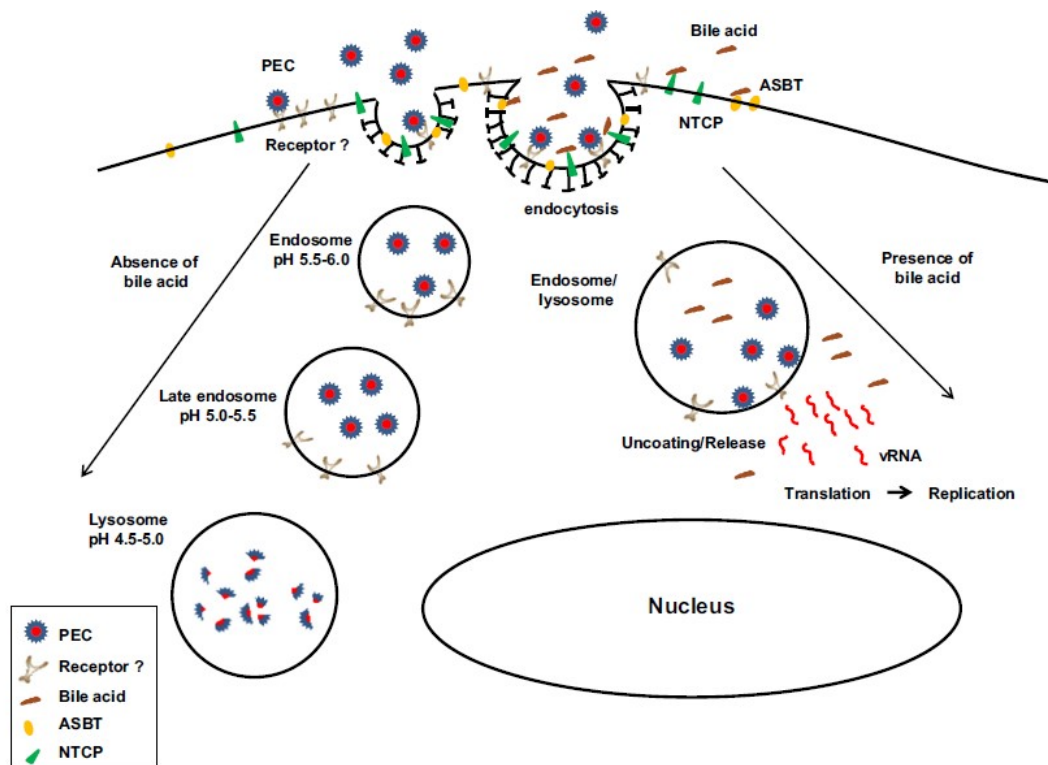


Figura 11: Modelo proposto para a replicação de PEC mediada pelos ácidos biliares em células LLC-PK. Neste modelo, PEC entra nas células pela via endocítica (através de receptores não identificados e alcança os endossomos tardio. Na presença dos ácidos biliares e transportadores, PEC escapa dos endossomos tardio dentro do citoplasma para iniciar a replicação viral. Na ausência de ácidos biliares ou transportadores dos ácidos biliares, PEC permanece no endossomo/lisossomo tardio e é destinado a ser degradado. Fonte: Shivanna 2014 com modificações.

Norovírus Humano (HuNoV)

A busca para o desenvolvimento de um sistema de cultura para HuNoV tem sido a razão de intensos esforços e longos anos de pesquisa. Várias tentativas de cultivo de HuNoV em células gastrointestinal, macrófagos ou células dendríticas foram sem sucesso (Duizer *et al.*, 2004, Lay *et al.*, 2010).

Um sistema organóide do epitélio intestinal reportado por Straub e colaboradores (2007) que apoiava a replicação de HuNoV não foi validado (Straub *et al.*, 2007).

Apesar desses contratempos, houve grandes avanços para replicar os HuNoV em linhagem celular de hepatoma humano mais precisamente na geração de sistema de replicon estáveis, o qual codificava o gene de resistência a neomicina dentro da ORF2 e consequentemente interrompia a expressão da VP1 intacta, mas preservava o promotor subgenômico, a ORF3 e o terminal genômico 3' (Chang *et al.*, 2006).

Além desse, outros estudos também ofereceram sua contribuição como o que demonstrou pela primeira vez a transfecção do RNA de HuNoV isolado de amostras fecais em células Huh-7 (Hepatoma humano), o qual permitiu um único ciclo de replicação. Estes resultados demonstraram que a maior dificuldade para estabelecer um sistema de genética reversa para HuNoV é a incapacidade do vírus de infectar célula a célula. Esta limitação pode ser devido à ausência de receptor ou co-receptor suscetível, falta de conteúdo de ácidos biliares ou ainda pode ser em virtude do efeito da sinalização antiviral (Guix *et al.*, 2007).

Mesmo com a ausência de uma plataforma de cultura celular susceptível dois sistemas de recuperação de HuNoV tem sido proposto. O primeiro foi uma adaptação do sistema MVA-T7 vírus *helper*, abordagem que foi aplicada para calicivírus felino. O genoma viral de HuNoV foi clonado *downstream* do promotor da T7 RNA polimerase e transduzidas com MVA-T7 e resultou na recuperação de partículas vazias (Asanaka *et al.*, 2005).

O segundo sistema substituiu o promotor T7 por um promotor eucariótico E1 α e também removeu o vírus *helper*. Apesar desse sistema ter permitido o empacotamento do genoma, ainda se restringia a uma única rodada de infecção e mesmo após a inserção do GFP na ORF1 entre a NS3 e NS4 manteve a produção de partículas empacotadas e produziu células fluorescentes (Katayama *et al.*, 2014). Estes replicons desenvolvidos no trabalho contém sequências nucleotídicas de origem não-viral. Esta inserção de nucleotídeos de origem não-viral pode influenciar negativamente na replicação de vírus.

2 OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Esse trabalho propõe a análise de sequenciamento genômico do HuNoV, desenvolvimento do clone infeccioso e replicon-GFP de HuNoV GII.4-2012 e estudo de localização intracelular da helicase e RdRp viral.

Objetivos Específicos

1. Sequenciar o genoma inteiro dos isolados HuNoV-393 e HuNoV-666 e estudar posição taxonômica do isolado
2. Construir o clone infeccioso e o replicon-GFP contendo o genoma inteiro do HuNoV-393 GII.4-2012 por *Gibson Assembly* a fim de compreender os estágios iniciais de replicação viral
3. Transfectar os plasmídeos pHuNoV-Inf e pHuNoV-GFP desenvolvidos em linhagens de células humanas Caco-2 e confirmar a infecção por microscopia confocal a laser.
4. Confirmar a síntese do RNA subgenômico por *Northern blotting*
5. Clonar os genes virais Helicase e RdRp em pcDNA nas posições N/C-terminal.
6. Confirmar a expressão das construções RdRp-C/N e Helicase –C/N em células Caco-2.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização molecular e filogenética

Dois isolados de HuNoV GII.4, HuNoV-393 e HuNoV-666, foram fornecidos pela Fundação Osvaldo Cruz (gentilmente cedido pelo Dr. Tulio M. Fumian, IOC/FIOCRUZ) como amostra de fezes. O RNA foi extraído usando ZR Soil/Fecal RNA Microprep™ kit (Zymo Research, Irvine, EUA) e o cDNA foi sintetizado a 47 °C usando SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) com oligodT50-M4 primer reverso (Tabela 1)

O cDNA foi então amplificado por PCR para produzir dois fragmentos (5' e 3') usando LongAmp Taq DNA Polymerase (New England BioLabs, Ipswich, EUA). Os *primers* HuNoV 5 Forward e HuNoV 3571 Reverse foram usados para amplificar a região 5', e os *primers* HuNoV 3510 Forward e M4 anchor Reverse (Tabela 1) foram usados para amplificar a região 3'. As regiões 5' e 3' foram amplificadas por PCR usando LongAmp Taq DNA polimerase (New England Biolabs) de acordo com orientações do fabricante. Para a amplificação da região 5' foi utilizado o programa: pré-tratamento de 80°C/1 min e 94 °C/30 seg, 35 ciclos de 94 °C/10 seg, 54°C/30 seg e 65°C/3 min, uma etapa de pós ciclo de 65°C/ 20 min. Para a região 3' pré-tratamento de 80°C/1 min e 94 °C/30 seg, 35 ciclos de 94 °C/10 seg, 54°C/30 seg e 65°C/4 min, uma etapa de pós ciclo de 65°C/ 20 min. Os amplicons da região 5' e 3' foram gel-purificado usando o *Gel Band Purification Kit* (GE Lifesciences, Chicago, EUA) e clonado no vetor pCR4-TOPO (Thermo Fisher Scientific) usando o TOPO TA Cloning Kit para Sequenciamento. A *Escherichia coli* cepa DH10B (preparo de acordo com Sambrook, 2001) foi transformada por eletroporação (Sambrook e Russel, 2001) com as construções e cultivada a 37 °C, e as sequências do plasmídeo foram confirmadas por sequenciamento Sanger pela Macrogen Inc. (Seoul, Coreia do Sul).

As sequências nucleotídicas HuNoV-393 e HuNoV-666 obtidas nesse estudo foram comparadas com as estirpes de referência disponíveis no NCBI GenBank. As sequências referentes as regiões genômicas VP1 e RdRp foram alinhadas com as sequências genômicas de GII.4 das últimas epidemias ocorridas nas últimas três décadas usando o software MUSCLE incluído no pacote do software MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). A árvore filogenética foi construída usando o método Neighbor-Joining usando

MEGA 7. A confiabilidade dos ramos interiores na árvore filogenética foi avaliada pelo método bootstrap com 1000 replicatas e a análise da identidade foi realizada pelo EMBOSS Needle (Pairwise Sequence Alignment). As sequências referências do genoma GII.4 foram referentes aos surtos desencadeados pelas variantes: Hunter (2004), New Orleans (2009), Laureans (2006a), Farmington Hills (2002), Minerva (2006b) e Sydney (2012). Ainda nesse trabalho foi investigado a presença de recombinações nas sequências HuNoV-393 e HuNoV-666, usando o software RDP v 3.44 (Martin, 2009).

3.2 Modificação do vetor pcDNA 3.1

A montagem completa do genoma viral foi realizada por amplificar as duas regiões genômicas e o vetor plasmidial backbone (pcDNA3.1 modificado) com a Phusion DNA High-Fidelity polymerase (New England Biolabs). Primeiramente, o vetor pcDNA3.1 (Fig. 12) foi modificado por remover o gene de resistência a Neomicina usando os *primers* pcDNA-Del Neo Forward, pcDNA-Del Neo Reverse (Fig 13A) (Tabela 1). Após a circularização do plasmídeo usando polynucleotide kinase e T4 DNA ligase (New England Biolabs), o plasmídeo resultante, foi transferido para *E. coli* cepa DH10B por eletroporação (Sambrook e Russel, 2001). Após a confirmação da sequência do plasmídeo por sequenciamento a sequência da ribozima Hepatite delta virus (HDV) foi adicionada ao plasmídeo pcDNA3.1 Neo-Del por PCR usando *primers* HDV-pcDNA Forward e pCMV Reverse (Tabela 1). Para essa reação foi utilizado a Phusion DNA High-Fidelity Polymerase (New England BioLabs, Ipswich, EUA) de acordo com orientações do fabricante. O seguinte programa foi utilizado: pré-tratamento de 80°C/1 min e 98 °C/30 seg, 25 ciclos de 98 °C/10 seg, (10 ciclos 55°C/ 30 seg) e (15 ciclos 65 °C/30seg), 72°C/5 min, uma etapa de pós ciclo de 72°C/ 10 min O plasmídeo resultante foi sequenciado por Sanger (Macrogen, Coréia do Sul) e denominado como pcDNA 3.1-Neo-Del- HDV (Fig. 13).

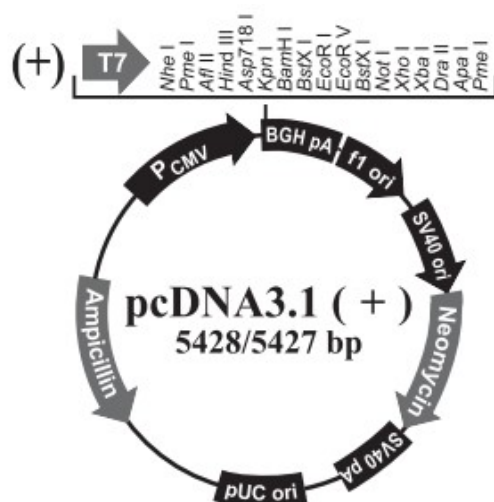


Figura 12: Mapa do vetor de expressão pcDNA3.1. pCMV = promotor *Human cytomegalovirus* (CMV), BGH pA = sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino, T7 = promotor T7, F1 Ori = origem de fita simples F1, SV40 ori = promotor *early* SV40, SV40 pA = sinal de poliadenilação SV40 e pUC ori = origem de replicação pUC.

Tabela 1: Sequência dos *primers* utilizados para a construção do pHuNoV-Inf e pHuNoV-GFP

Primer	Sequence 5'-3'
oligodT50-M4	GTT TTC CCA GTC ACG AC T ₅₀
HuNoV 5 Forward	GTG AAT GAA GAT GGC GTC TAA CG
HuNoV 3571 Reverse	TTC AAG TGT GGC TTC TCC CTC
HuNoV 3510 Forward	AAC ACT GTC ATA TGT GCC AC
M4 anchor Reverse	GTT TTC CCA GTC ACG AC T
pcDNA-Del Neo Forward	CTT GGC GTA ATC ATG GTC ATA G
pcDNA-Del Neo Reverse	GAT ACC CCC TAG AGC CCC
HDV_pcDNA For	GGG TCG GCA TGG CAT CTC CAC CTC CTC GCG GTC CGA CCT GGG CAT CCG AAG GAG GAC GTC GTC CAC TCG GAT GGC TAA GGG AGA GCC CTC GAC TGT GCC TTC TAG T
pcDNA-CMV Reverse	GTT AGC CAG AGA GCT CTG CTT ATA TAG AC
CMV-5 Forward	GAG CTC TCT GGC TAA CGT GAA TGA AGA TGG CGT CTA ACG
HuNoV 5 Reverse	ACA CGG TGG GTC CCC TCA CTC CCT CT
HuNoV 3 Forward	AGG GGA GTG AGG GAG AAG CCA CAC TTG
OligodT50-Ribo Reverse	GAT GCC ATG CCG ACC CT ₅₀ AAA GAC ACT AAA GAA AAG C
HDV Forward	GGG TCG GCA TGG CAT CTC
eGFP Forward	TAT GAA CTG CAA GGC CCC GAG GAC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GA

eGFP Reverse	GTC CTC AGG TCC CTG CAG CTC GTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC
HuNoV N-terminal Reverse	GTC CTC GGG GCC TTG CAG TTC ATA ATC ACC TAG
HuNoV C-terminal Forward	GCA GGG ACC TGA GGA CCT TGC AGT GGA ACT GGT CCC
Shell Forward	TGCTAGCATGAAGATGGCGTCGAATGA
Shell Reverse	GTTAGGAATAATTTCTATCATCTCGAGT

3.3 Construção do cDNA do genoma inteiro

A extração de RNA do HuNoV-393 foi realizada usando o TRIzol® Reagente (Thermo Fisher Scientific) e o cDNA foi sintetizado à 47 °C usando SuperScript® III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific). Posterior a síntese do cDNA genômico foi realizado a PCR dividindo o genoma em duas regiões (5' e 3') com 15 nucleotídeo sobrepondo a região média do genoma. As regiões 5' e 3' foram amplificadas por PCR usando Phusion DNA High-Fidelity Polymerase (New England BioLabs) com os *primers* HuNoV 5 Forward, e HuNoV 3571 Reverse e HuNoV 3510 Forward e M4 anchor Reverse primer, respectivamente (Tabela 1). As regiões 5' e 3' foram clonadas no vetor pCR4 TOPO TA (Invitrogen) e as sequências dos fragmentos genômicos foram confirmadas por sequenciamento Sanger.

Os três fragmentos foram gel-purificados, eluídos usando illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Lifesciences) e montado na reação isotérmica a 50 °C por 2 h usando *Gibson Assembly* Cloning Master Mix (New England Biolabs). A proporção molecular do vetor plasmidial e fragmentos inseridos 5' e 3' foi 1:2:2 (100:160:160 em nanogramas) para uma reação (Fig. 14).

Então a solução foi dialisada em uma membrana de nitrocellulose (MF-Membrane Filters VSWP, 0.25µm, Merck Millipore, Billerica, USA) em água Milli-Q (Merck Millipore) por 15 min, e *E. coli* DH10B foi transformada por eletroporação (Sambrook e Russel, 2001) com a construção. *E.coli* transformada foi incubada a 28 °C para todo o cultivo para reduzir o risco de mutações não desejadas durante o cultivo. A sequência plasmidial foi confirmada na MacroGen Inc. por sequenciamento Sanger e resultou em um plasmídeo nomeado como pHuNoV-Inf (Fig. 14A).

Para facilitar o reconhecimento da infecção, o gene GFP foi incorporado no gene da poliproteína, usando o protocolo *Gibson Assembly*. O gene repórter foi

adicionado entre Helicase e p22, reproduzindo o sítio de clivagem da protease viral (YELQ/GPED) adjacente ao gene eGFP. Para este propósito, o gene eGFP foi amplificado usando os *primers* eGFP Forward e eGFP Reverse (Tabela 1) e a construção plasmidial selecionado como clone infeccioso de pHuNoV-Inf foi usado com um molde para amplificar e inserir os sítios de clivagem usando os *primers* HuNoV N-terminal Reverse e C-terminal Forward (Tabela 1). Todos fragmentos foram purificados usando GFX PCR DNA e *Gel Band Purification Kit* (GE Lifesciences) e após a clonagem usando a reação *Gibson Assembly*, os plasmídeos selecionados foram sequenciados na Macrogen Inc. e nomeado como pHuNoV-GFP (Fig. 14B). O pcDNA-GFP (gentilmente cedidos por Sr. João Marcos Fagundes Silva, Biologia Molecular, UnB) foi usado como controle para os próximos ensaios.

Após a confirmação da clonagem do pHuNoV-Inf por sequenciamento de Sanger, a célula de adenocarcinoma coloretal (Caco-2) foi plaqueada em placas de 24 poços com o meio RPMI 1640 sem vermelho fenol (Thermo Fisher Scientific) e transfectada pela construção (1 µg) usando Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific). Após 24 horas de incubação, as células foram fixadas com 3% de paraformaldeído e 0.1% glutaraldeído por 10 min seguido por permeabilização com Triton-X100 (0.2 % diluído em 1 × PBS) por 20 min a temperatura ambiente. As células transfectadas foram bloqueadas com 1 × PBS contendo 3% de albumina do soro bovino (BSA) por 20 min. O antissoro policlonal contra VP1 de HuNoV (gentilmente cedido por Dr. Lucimeire Antonelli da Silveira, Universidade Federal de Goiânia, Brasil) diluído com 1:100 foi adicionado e incubado por 2 horas. Células foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 633 (1:500) (Thermo Fisher Scientific). O núcleo foi marcado com a solução de 10 µM DAPI por 10 min. Todas as etapas de incubações foram executadas a temperatura ambiente e as células foram lavadas por três vezes com PBS 1X. As células processadas foram analisadas por microscopia confocal modelo TCS-SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). O replicon pHuNoV-GFP (Fig.14B) e a construção controle, pcDNA-GFP, foi transfectada para a célula Caco-2 na mesma condição descrita acima. A expressão do GFP foi observada em microscopia confocal a laser (Leica TCS-SP5) 24, 48 e 72 horas pós-transfecção (h.p.t).

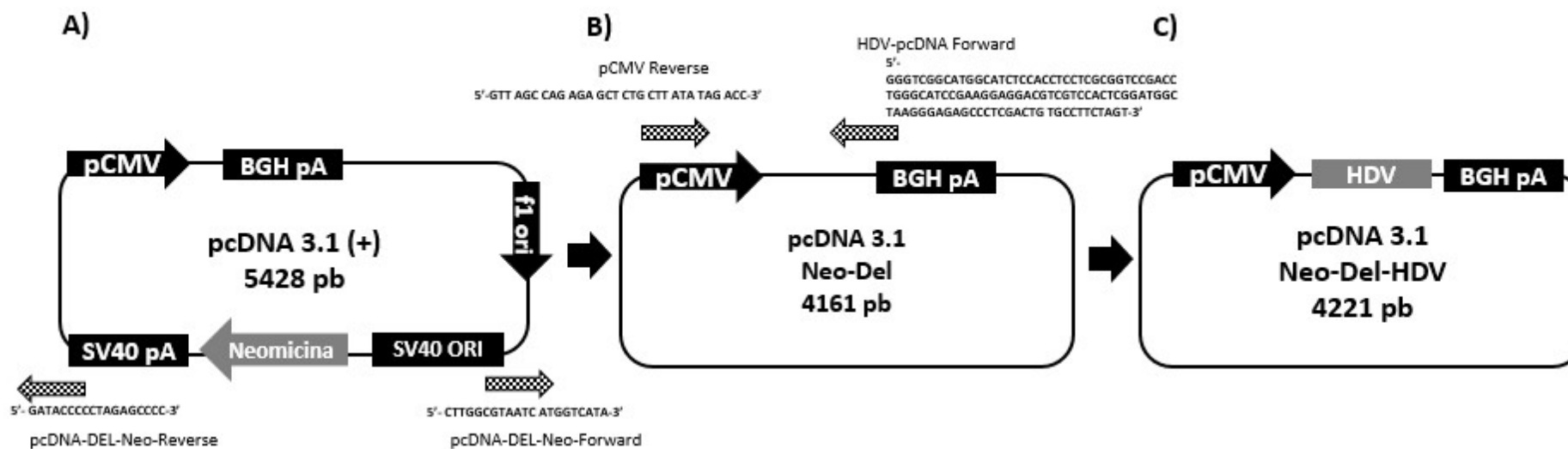


Figura 13: Representação das modificações realizadas no pcDNA 3.1. A). Os *primers* pcDNA-DEL-Neo- Forward/Reverse foram utilizados para remover o gene de resistência a Neomicina, SV40 ori e SV40 pA. B). Os *primers* HDV-pcDNA Forward/Reverse foram utilizados para incluir o gene da ribozima do vírus da Hepatite Delta (HDV) na construção pcDNA 3.1 Neo-Del, o que resultou na construção pcDNA 3.1 Neo-Del-HDV.

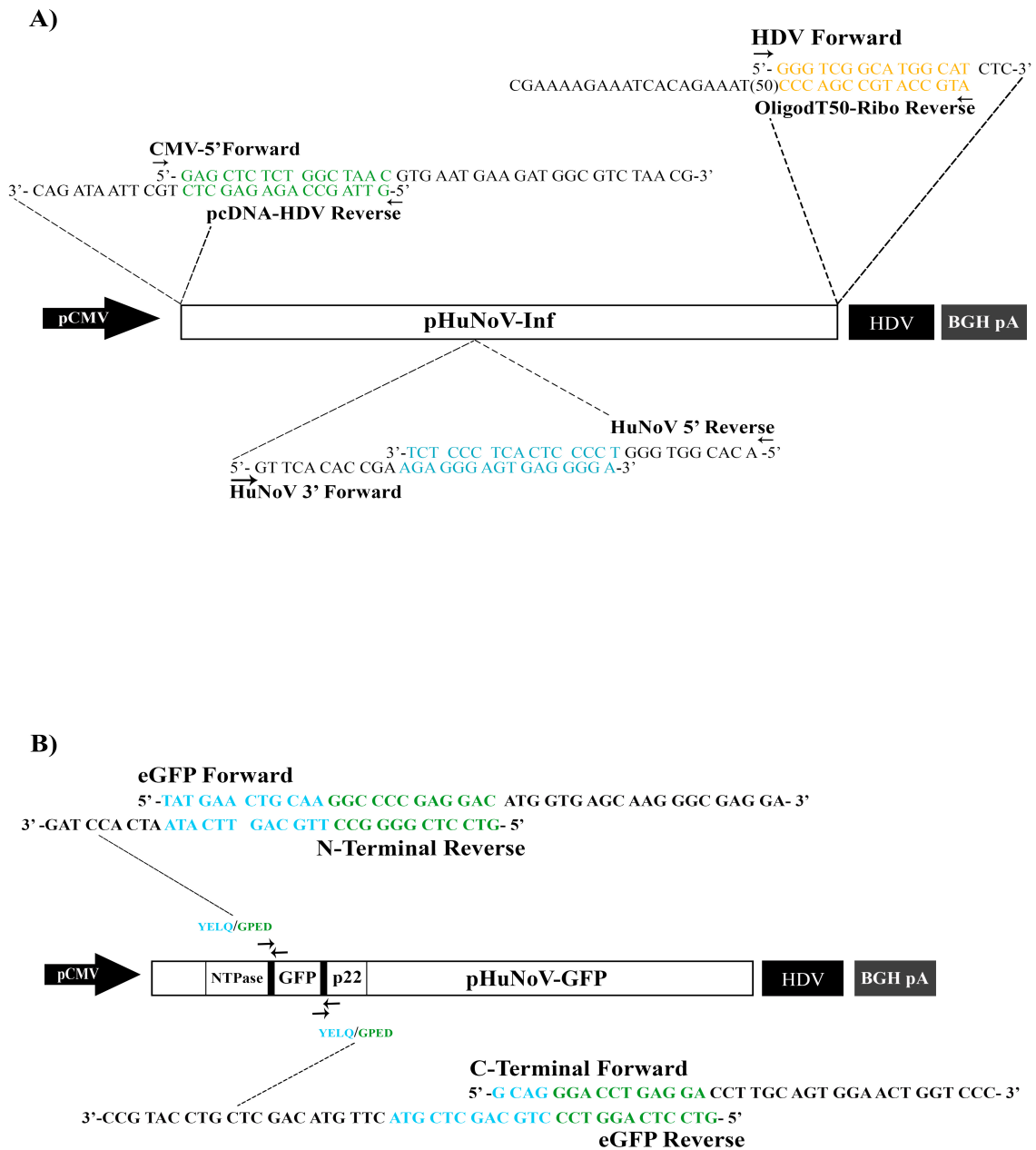


Figura 14: Estratégia para o desenvolvimento do clone infeccioso e replicon. A) Primeiro *Gibson assembly* para a clonagem do genoma inteiro do HuNoV em pcDNA Δ elNeo-HDV, resultado em pHuNoV-Inf. B) Replicon pHuNoV-GFP contendo GFP entre os sítios de clivagem proteolítica YELQ/GPED (indicado por setas pretas entre genes, Helicase and p22).

A imunomarcção em células transfectadas pelo replicon pHuNoV-GFP foi realizada seguindo as mesmas etapas do ensaio de pHuNoV-Inf, porém, após 48 h pós-transfecção (h.p.t) as células Caco-2 foram fixadas (3% paraformaldeído e 0,1% glutaraldeído) por 10 min seguido por permeabilização com Triton X100 (conc. final 0,2% diluído em PBS 1X) por 20 min a temperatura ambiente e bloqueio por 20 min em PBS 1X contendo 3 % de BSA. O antissoro policlonal (1:100) (contra VP1 HuNoV 2006) foi adicionado e incubado por 2 horas. As células foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 633 dyes (1:500) (Thermo Fisher Scientific). O núcleo foi corado com a solução de 10 µM DAPI por 10 min. Todas as etapas de incubações foram realizadas a temperatura ambiente e as células foram lavadas três vezes com PBS 1X entre cada etapa. As células coradas foram analisadas por microscopia confocal em 48 h.pt.

O RNA viral, produto da replicação viral, foi analisado por *Northern blotting*. Para preparar a sonda de RNA, o plasmídeo molde foi construído pela inserção da região genômica do *shell domain* do capsídeo de HuNoV em pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, EUA). Para isso, inicialmente foi realizado a amplificação do gene *shell domain* do capsídeo por PCR utilizando o programa: pré-tratamento de 80°C/1 min e 94°C/ 2 min, 25 ciclos de 94°C/30 seg, 55°C/1 min e 65°C/ 1 min, uma etapa de pós ciclo de 65°C/ 10 min. Essa reação foi realizada utilizando a enzima LongAmp *Taq* DNA polimerase (NEB) e os *primers* shell forward e shell reverse (Tabela 1). Para aumentar a eficiência da clonagem, o produto de PCR amplificado foi adenilado usando 0,1 µl de *Taq* DNA polimerase comum (NEB) e dATPs 0.2 mM e incubado a 70°C/ 30 min no termociclador. A região shell domain amplificada e adenilada foi clonada em pGEM- T Easy (Promega) de acordo com as instruções do fabricante, gerando o clone pGEM -S

O pGEM-S foi linearizado com *Apal* (New England Biolabs) para permitir o *run off* dos transcritos de RNA a ser sintetizados. A sonda de RNA marcada com digoxigenina foi preparada por transcrição *in vitro* usando SP6 RNA polimerase de acordo com as instruções do fabricante (Thermo Fischer Scientific). O RNA total foi isolado por TRIzol LS reagent (Thermo Fischer Scientific) e o *Northern blotting* foi realizado de acordo com o método padrão (Sambrook e Russel, 2001) e utilizando o ssRNA ladder como marcador (New England Biolabs).

3.4 Clonagem dos genes não estruturais Helicase e RdRp

Para iniciar o estudo dos sítios de replicação do HuNoV, foram escolhidas duas proteínas envolvidas na replicação viral para identificar o local de retenção na célula. Para este objetivo, os genes que codificam a proteína Helicase e RdRp foram amplificados por PCR do HuNoV GII.4-2012, utilizando *primers* que flanqueiam cada região específica.

As reações para amplificar o gene da Helicase possuíam respectivamente: 1µl de cDNA (1ng), 5µl de tampão LongAmp (5X), 1µl de LongAmp (NEB), 4µl de dNTPs (2,5mM), 1µl do primer Helicase-START-BamHI Forward (10µM) e Helicase-NotI Reverse (10 µM), para clonar o gene da Helicase em fusão com GFP na posição N-terminal ou Helicase-BamHI Forward (10µM) e Helicase-STOP-NotI Reverse, para clonar o gene da Helicase em fusão com GFP na posição C-terminal (Tabela 2). Para amplificar os genes das RdRp N ou C-terminal foi realizada a seguinte reação respectivamente: 1µl de cDNA (1ng), 5µl de tampão LongAmp (5X), 1µl de LongAmp (NEB), 4µl de dNTPs (2,5mM), 1µl de *primer* RdRp START-BamHI Forward e RdRp-NotI Reverse (RdRp no terminal N) ou RdRp-BamHI Forward e RdRp-STOP-NotI Reverse (RdRp no terminal C) (Tabela 2).

Tabela 2: Lista de *primers* utilizados para a amplificação dos genes Helicase e RdRp.

Primer	Sequence 5'-3'
Helicase-START-BamHI Forward	TAT AGG ATC CAC CAT GGG ACC TGA GGA CCT TGC AGT
Helicase-NotI Reverse	TAT AGC GGC CGC GAT TGC AGT TCA TAT TCA TCT
Helicase-BamHI Forward	TAT AGG ATC CGG GAC CTG AGG ACC TTG CAG T
Helicase-STOP-NotI Reverse	TAT AGC CGC CGC TAT TGC AGT TCA TAT TCA TCT
RdRp START-BamHI Forward	TAT AGG ATC CAC CAT GGG AGG TGA CAG TAA AGG GAC AT
RdRp-NotI Reverse	TAT AGC GGC CGC TCG ACG CCA TCT TCA TTC A
RdRp-BamHI Forward	TAT AGG ATC CCG GAG GTC ACA GTA AAG GGA CAT
RdRp-STOP-NotI Reverse	TAT AGC GGC CGC TAC TCG ACG CCA TCT TCA TTC A

pcDNA XhoI Reverse	TAT ACT CGA GCA GCT TGG GTC TCC CTA TAG TGA G
pcDNA Pac Forward	TAT ATT AAT TAA CCG CTG ATC AGC CTC GAC
pK7WGF PacI Forward	TAT ATT AAT TAA ACC ACT TTG TAC AAG AAA GCT GAA CG
pK7WGF Xho I Reverse	TAT ACT CGA GGC CAC CAT GGT GAG CAA GGG CGA G
pK7FWG PacI Forward	TAT ATT AAT TAA TTA CTT GTA CAG CTC CA
pK7FWG XhoI Reverse	TAT ACT CGA GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC TG

Para a recuperação do DNA do gel, os fragmentos submetidos a eletroforese, corados com violeta cristal (10µg/mL) e eluídos seguindo o protocolo de purificação *Gel Band Purification* (GE Healthcare Life Sciences).

Os genes amplificados foram clonados em vetor plasmidial pENTR 2B da tecnologia Gateway com a finalidade de clonar nos vetores destinatários em forma de fusão com GFP. A tecnologia Gateway, utiliza um sistema que permite realizar a clonagem por recombinação sítio-específica, tornando o processo rápido e eliminando etapas de clonagem e subclonagem tradicionais. Esta tecnologia é baseada na propriedade de recombinação sítio-específica do bacteriófago-lambda no cromossomo da *E. coli*. A reação acontece entre sítios específicos de interação (*att*) presentes no DNA do bacteriófago e da bactéria – *attB* presente no cromossomo na *E. coli*, -*attR* no cromossomo do bacteriófago. Esta reação é catalisada por um conjunto de enzimas. As proteínas de recombinação envolvidas na reação diferem se o bacteriófago utiliza a via lítica ou lisogênica (Landy, 1989). A via lisogênica é catalizado pela integrase no bacteriófago λ (*Int*) e o fator de integração do hospedeiro da *E. coli* (*IHF*). Enquanto que a via lítica é catalisada pelo *IHF* e pela excisionase e *Int* do bacteriófago (Mix de enzima LR clonase) (Ptashne, 1992).

No ciclo lisogênico a reação de recombinação ocorre entre as regiões *attB* e *attP*, resultando na formação dos sítios de interação *attL* e *attR*. No ciclo lítico a recombinação ocorre *attL* e *attR* resultando na restauração dos sítios de interação *attB* e *attP*. A simulação *in vitro* do ciclo lítico é realizada por um vetor de entrada (possui sítio *attL*) e por um vetor destinatário (possui o sítio *attR*) (Hartley *et al.*, 2000). Para esta finalidade foi escolhido o pENTR 2B como o vetor de entrada e o pcDNA 3.1 modificado (contendo o gene repórter GFP) como vetor destinatário. Ambos vetores,

pENTR 2B e pcDNA 3.1 modificado possuem dois sítios de recombinação específicos (attL e attR, respectivamente), flanqueando um cassete contendo o gene de resistência a clorafenicol (CmR) e um gene de seleção negativa (ccdB). O gene ccdB codifica uma proteína (CcdB) que interfere na DNA girase da *E. coli* inibindo o seu crescimento (Bernard e Couturier, 1992). Quando a recombinação não ocorre e o ccdB não é substituído pelo gene de interesse, as bactérias que receberam o vetor contendo o gene ccdB não crescerão. Após a reação de recombinação da LR clonase II, o cassete é substituído pelo gene de interesse (Fig. 15)

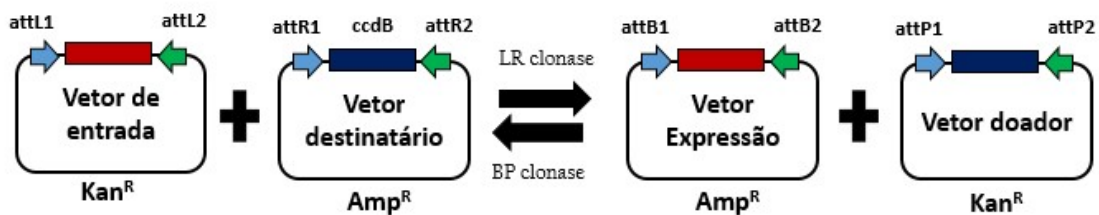


Figura 15 : Representação esquemática da reação de recombinação LR

O vetor pENTR 2B (Fig. 16) e os fragmentos de cDNA dos genes purificados foram digeridos com BamHI e NotI (NEB) de acordo com orientações do fabricante. As ligações dos genes, Helicase ou RdRp em vetor pENTR 2B foram realizadas utilizando 80ng de vetor, 100ng Helicase N/C-terminal ou 150ng da RdRp N/C-terminal e na presença de 1µl T4 DNA ligase, 1µl de tampão da T4 DNA ligase 10X para uma reação total de 10µl em 8 °C por noite toda.

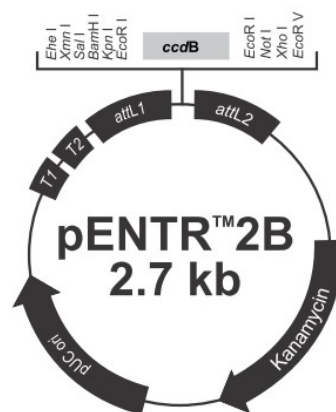


Figura 16: Esquema representativo do plasmídeo comercial pENTR 2B. É possível observar os sítios de recombinação *attL1* e *attL2*, gene *ccdB* (gene que codifica uma proteína que interfere com a DNA girase bacteriana), gene de resistência para canamicina, *rrnB* T1, *rrnB* T2 (sequências de terminações da transcrição) e origem de replicação PUC.

As construções em pENTR 2B foram transferidas para *E. coli* da cepa DH10B por eletroporação (Sambrook e Russel, 2001) e em seguida os clones foram enviados para o sequenciamento na Macrogen.

Para a reação de recombinação foi necessário modificar o vetor destinatário, pcDNA 3.1, com a inserção dos sítios de recombinação attR1 e attR2 e dos genes mGFP N/C-terminal (Fig. 17) e CFP N/C-terminal (Fig. 18). Esta modificação foi realizada pelo aluno de mestrado, João Marcos Fagundes por meio de comunicação pessoal.

A reação de recombinação entre o pENTR 2B e o pcDNA modificado foi realizada seguindo orientações do fabricante Gateway Technology (Thermo Fisher Scientific) com LR clonase. Nesta reação foram utilizados (75ng de vetor pENTR 2B-RdRP (C/N-terminal) (Fig. 19A e 19D) ou Helicase (C/N-terminal) (Fig. 20A 20D) com 75ng de pcDNA-WGF2/FWG2 (Fig. 19B e 19E) ou pcDNA-WGC2/CWG2, respectivamente de acordo com o fabricante. A cepa *E. coli* DH10B foi transformada por eletroporação (Sambrook e Russel, 2001) com estas construções e todas as clonagens foram confirmadas por sequenciamento (Macrogen. Inc.).

A transfecção de cada construção em células Caco-2 foi realizada com lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific), seguindo as orientações do fabricante. Os sinais da fluorescência, os quais indicam a localização das proteínas fusionadas de cada gene foram avaliadas por microscopia confocal a laser após 24 horas de transfecção.

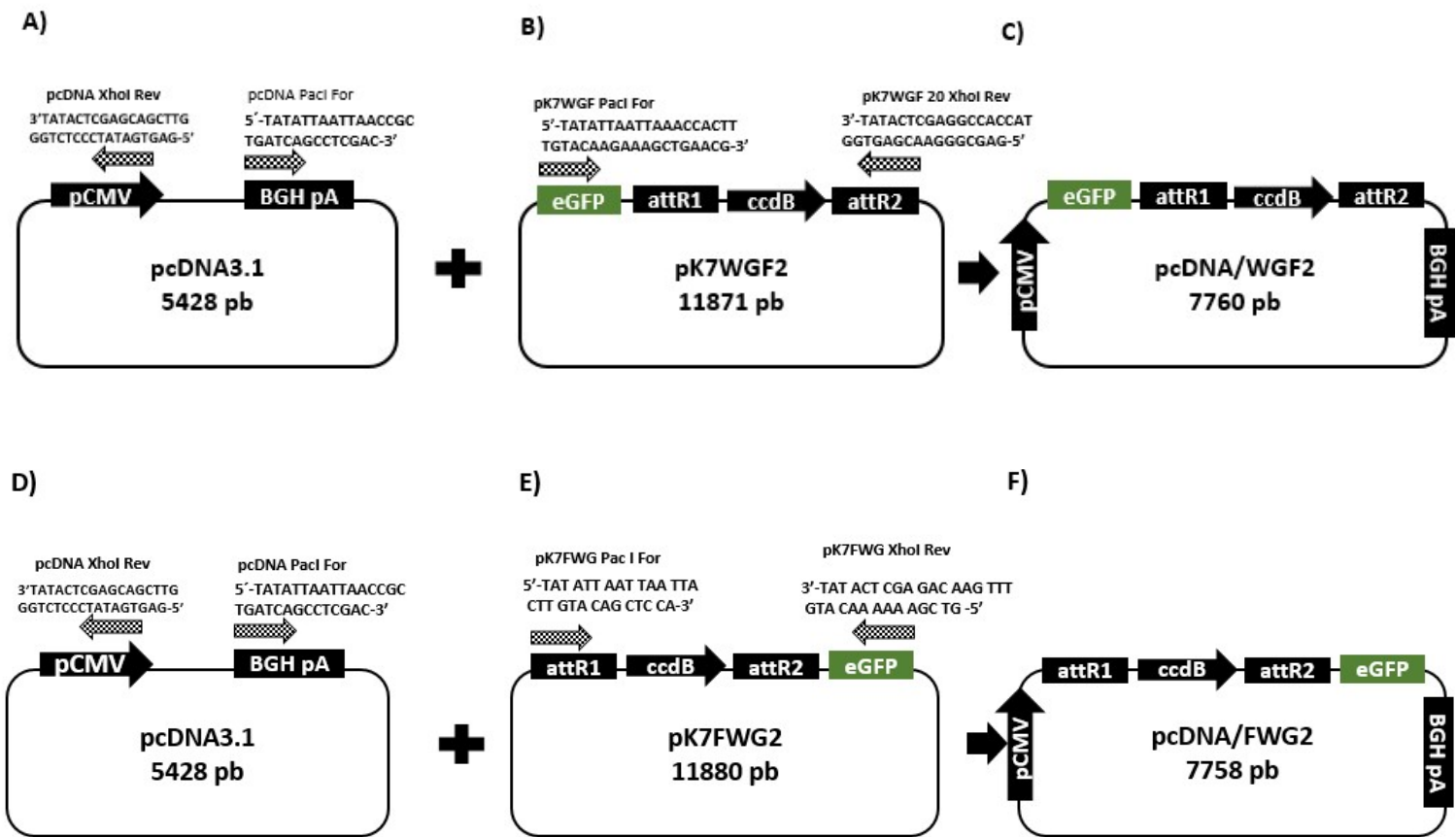


Figura 17: Esquema representativo da modificação do pcDNA/WGF2/FWG2. A e D) Exclusão do sítio múltiplo de clonagem com os *primers* pcDNA Pac For I e pcDNA XhoI Rev. B) Amplificação dos sítios de recombinação e eGFP proveniente do pK7WGF2. C) pcDNA modificado contendo os sítios de recombinação e o eGFP na posição N-terminal. E) Amplificação dos sítios de recombinação e eGFP proveniente do pK7FWG2. F) pcDNA modificado contendo os sítios de recombinação e o eGFP na posição C-terminal.

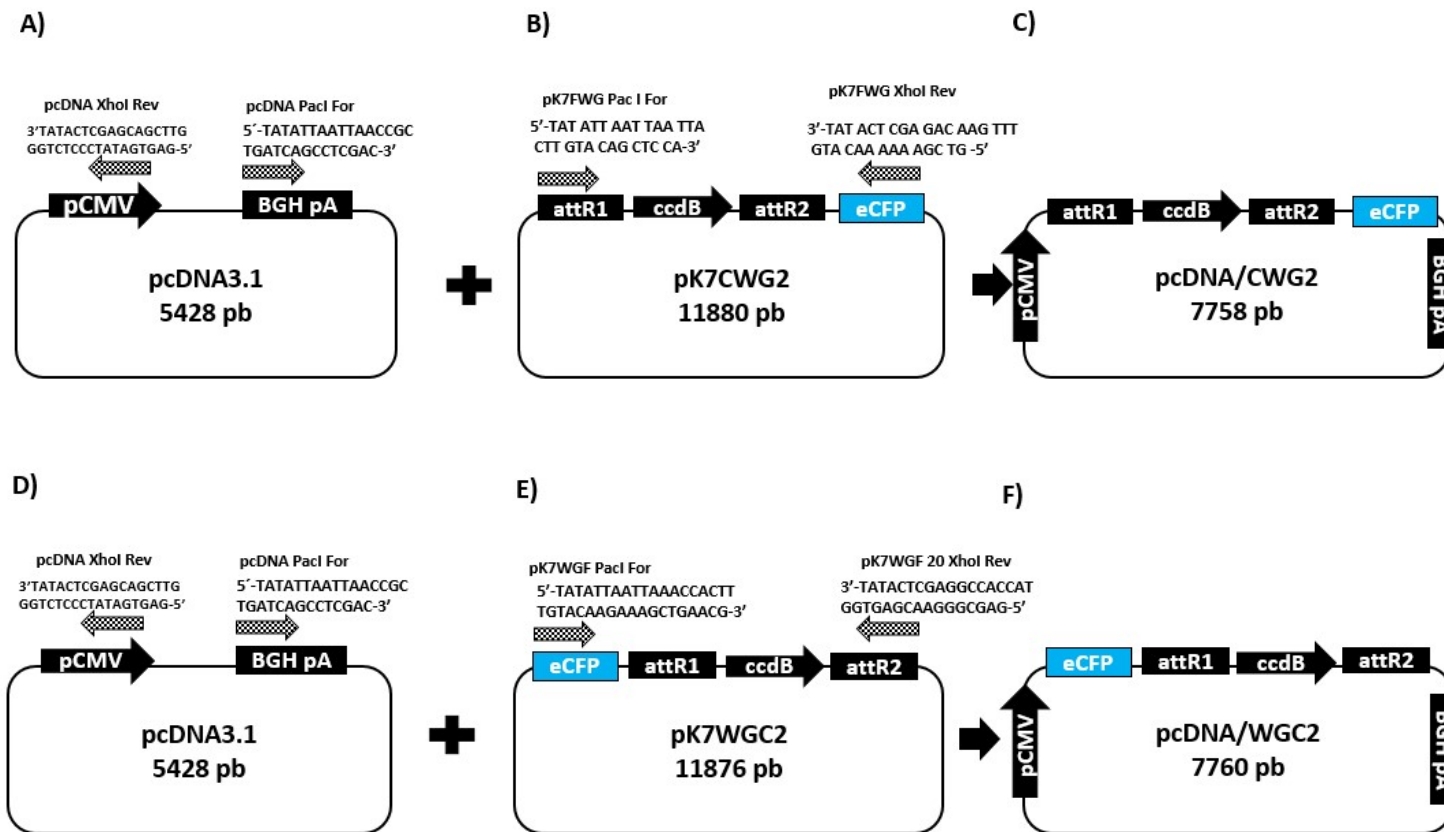


Figura 18: Esquema representativo da modificação do pcDNA/CWG2/WGC2. A e D) Exclusão do sítio múltiplo de clonagem com os *primers* pcDNA Pac For I e pcDNA XhoI Rev. B) Amplificação dos sítios de recombinação e eCFP proveniente do pK7CWG2. C) pcDNA modificado contendo os sítios de recombinação e o eCFP na posição C-terminal. E) Amplificação dos sítios de recombinação e eGFP proveniente do pK7WGC2. F) pcDNA modificado contendo os sítios de recombinação e o eCFP na posição N-terminal.

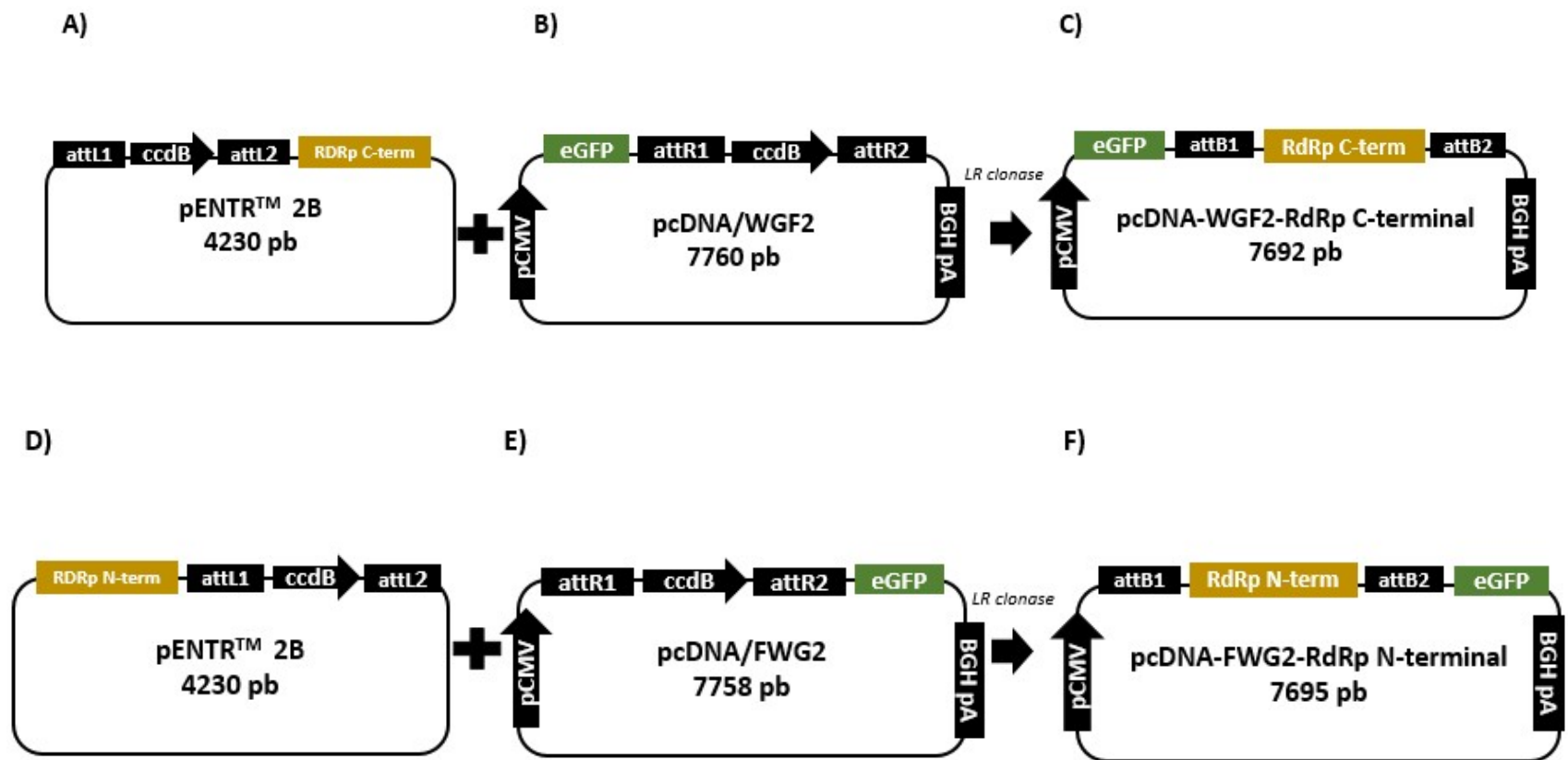


Figura 19: . Representação da reação de recombinação. Entre pENTR-RdRp C/N-term e pcDNA/WGF2/FWG2. A) Vetor pENTR™ 2B contendo a RDRP-C-terminal. B) Vetor pcDNA/WGF2 contendo o eGFP na posição N-terminal. C) pcDNA/WGF2 contendo a RDRp-C-term. D) Vetor pENTR™ 2B contendo a RDRP-N-terminal. E) Vetor pcDNA/FWG2 contendo o eGFP na posição C-terminal. F) Vetor pcDNA-FWG2/RdRp-N-term contendo a RdRp-N terminal e eGFP na posição C-terminal.

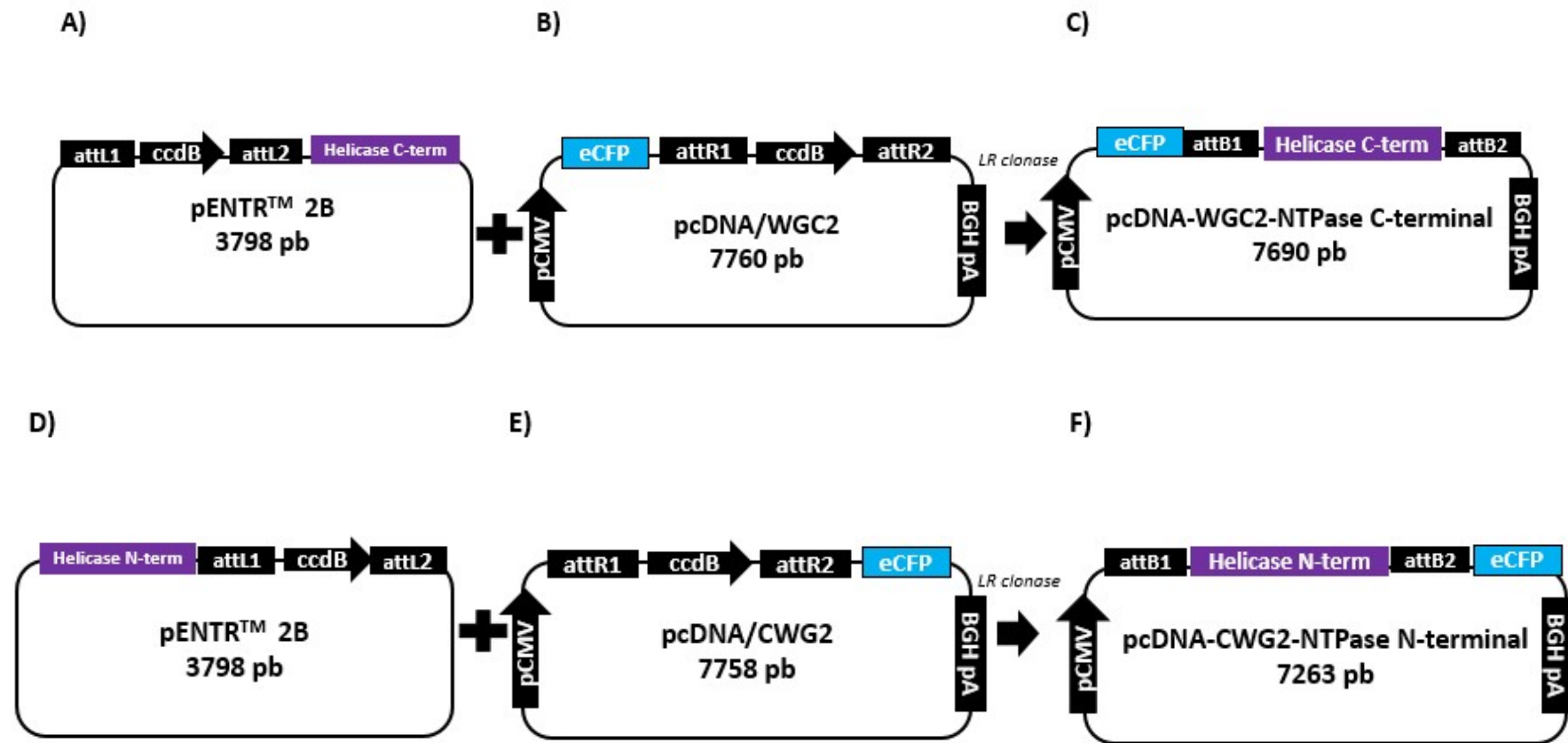


Figura 20: Representação da reação de recombinação entre pENTR-NTPae C/N term e pcDNA- WGC2/CWG2. A) Vetor pENTR™ 2B contendo a Helicase-C-terminal. B) Vetor pcDNA/WGC2 contendo o eCFP na posição N-terminal. C) pcDNA/WGC2 contendo a Helicase-C-term. D) Vetor pENTR™ 2B contendo a Helicase-N-terminal. E) Vetor pcDNA/CWG2 contendo o eCFP na posição C-terminal. F) Vetor pcDNA-CWG2/Helicase-N-term contendo a Helicase-N terminal e eGFP na posição C-term

4. RESULTADOS

4.1 RT-PCR do HuNoV-2012 e clonagem em pCR4-TOPO

O cDNA de HuNoV-393 e HuNoV-666 sintetizados pela transcriptase reversa foram utilizados como molde para amplificação por PCR das duas regiões genômicas (regiões 5' e 3') o que resultou nos fragmentos de 3570 pb (região 5') e 3979 pb (região 3') (Fig. 21 e 22).

Os fragmentos de DNA amplificados e purificados foram clonados no vetor pCR4-TOPO e a sua inserção foi confirmada primeiramente por linearização com a enzimas Pst1 (NEB) (Fig. 23 e 24) e por eletroforese. As clonagens foram confirmadas por sequenciamento e analisadas no programa STADEN Package. A sequência genômica foi analisada utilizando os programas descritos no Material e Métodos (3.1 Caracterização molecular e filogenética).

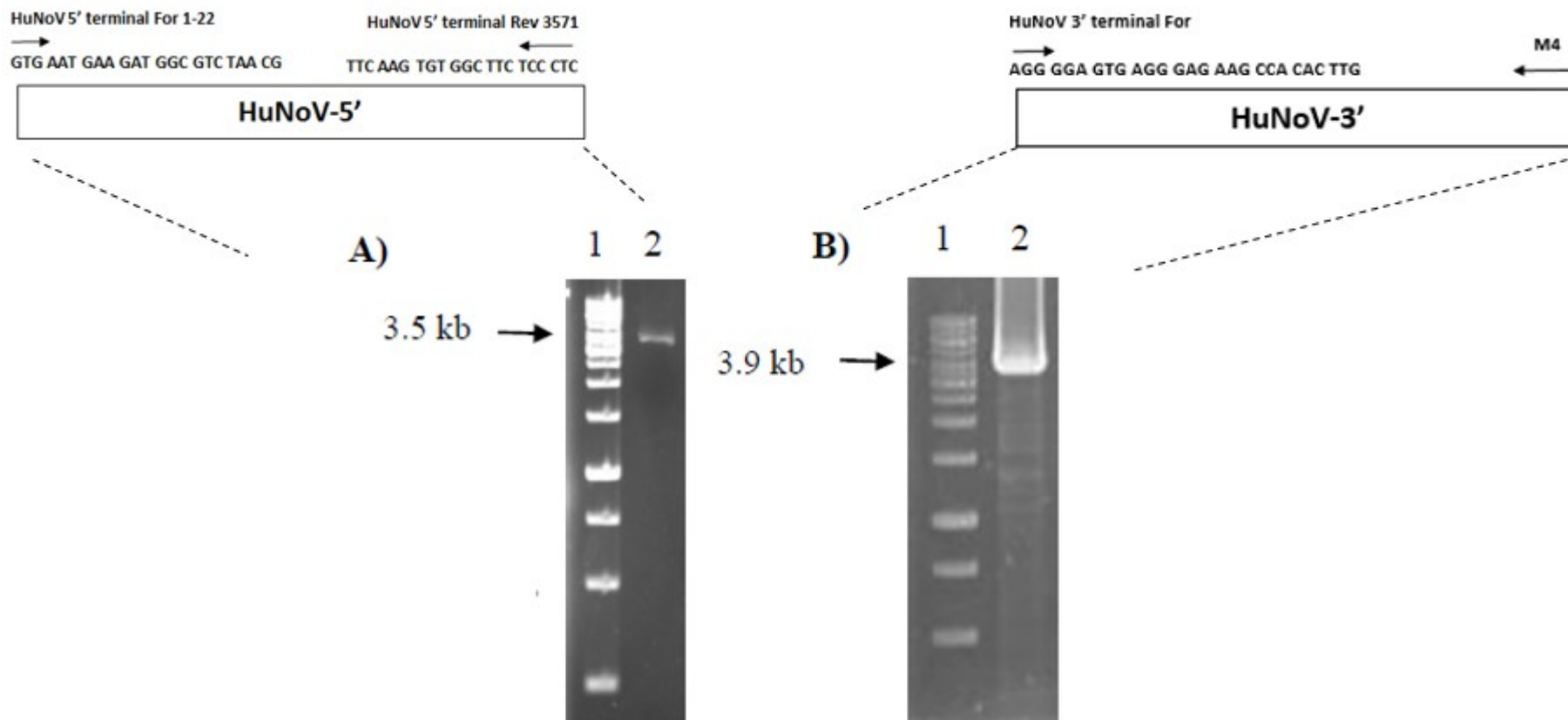


Figura 21: Eletroforese em gel de agarose 1% com cDNA de HuNoV-393 amplificado por PCR. A) Poço 1: Marcador de massa molecular 1kb DNA ladder (Thermo Scientific), poço 2: fragmento de tamanho 3.5kb correspondente ao terminal 5' do genoma. B) Poço 1: Marcador de massa molecular 1kb DNA ladder (Thermo Scientific), poço 2: Fragmento de tamanho 3.9kb correspondente ao terminal 3' do genoma.

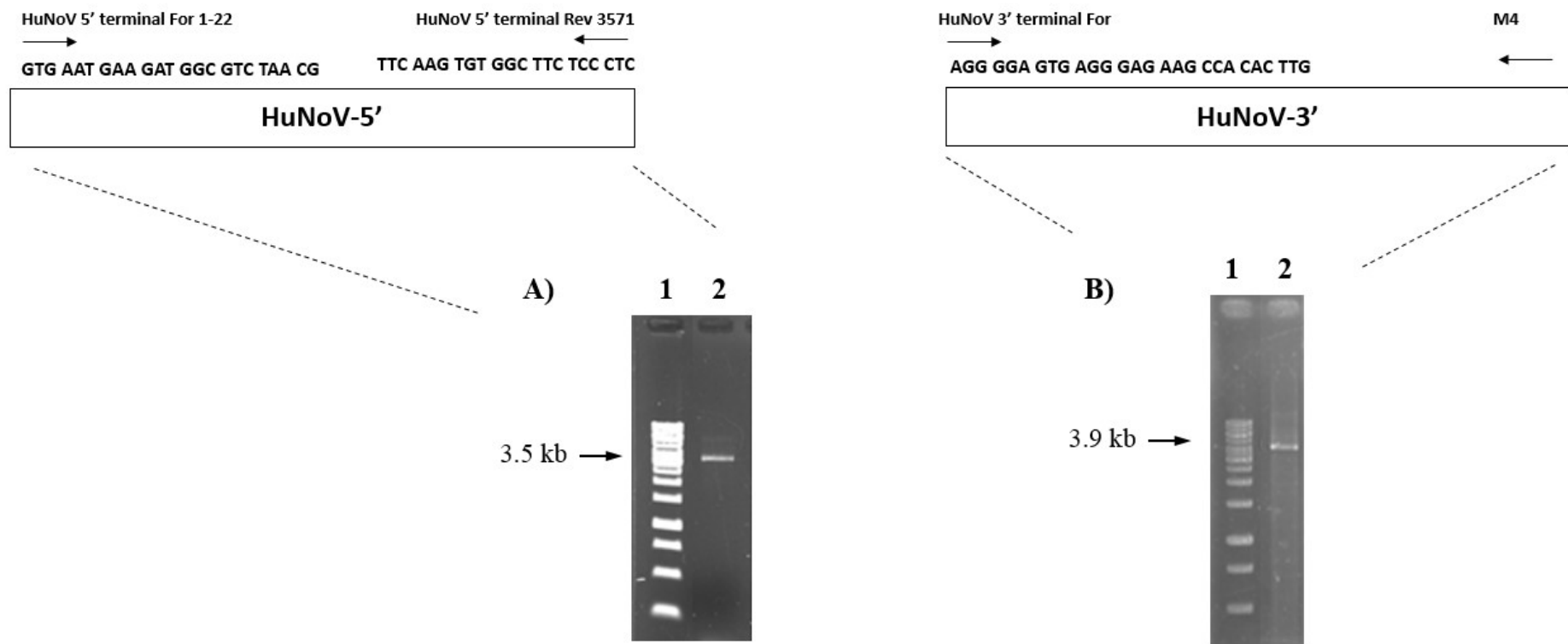


Figura 22: Eletroforese em gel de agarose 1% com cDNA de HuNoV-666 amplificado por PCR. A) Poço 1: Marcador de massa molecular 1kb DNA ladder (Thermo Scientific), poço 2: fragmento de tamanho 3.5kb correspondente ao terminal 5' do genoma. B) Poço 1: Marcador de massa molecular 1kb DNA ladder (Thermo Scientific), poço 2: Fragmento de tamanho 3.9kb correspondente ao terminal 3' do genoma.

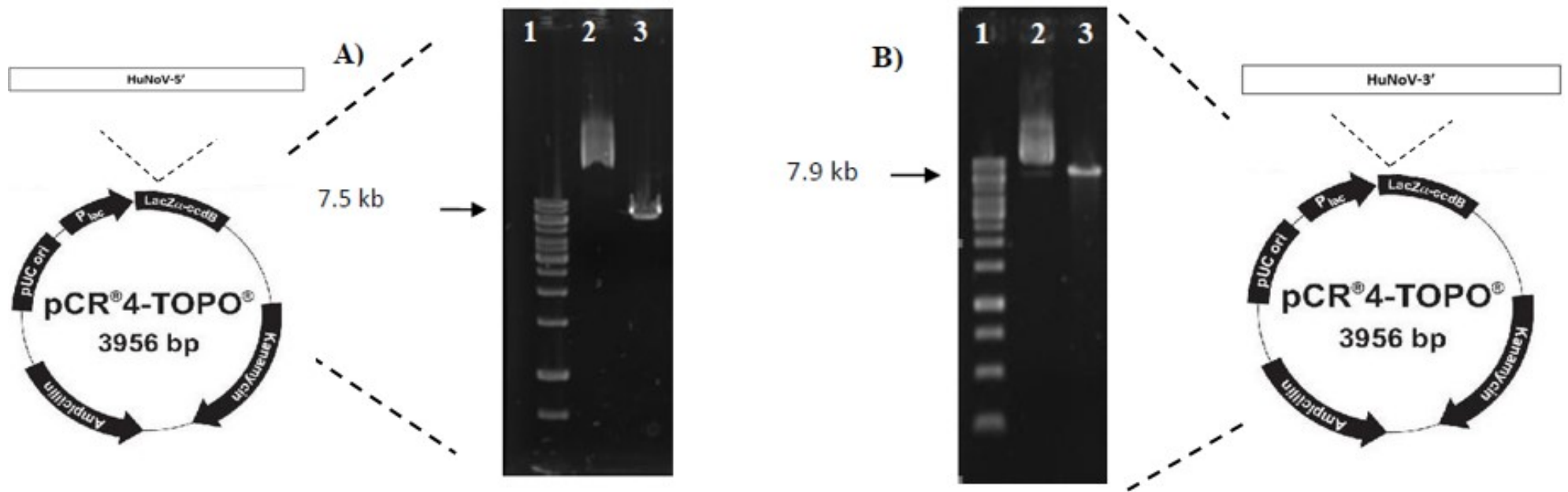


Figura 23: Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando perfil de enzimas de restrição dos clones HuNoV-393 em pCR4-3'HuNoV e pCR4-5'HuNoV com Pst1. A) Poço 1: Marcador de massa molecular 1 kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific), Poço 2: pCR4-TOPO contendo o terminal 5' do HuNoV não digerido. Poço 3: pCR4-TOPO-5'HuNoV digerido com Pst1. B) Poço 1: Marcador de massa molecular 1 kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific). Poço 2: pCR4-TOPO contendo o terminal 3' do HuNoV não digerido. Poço 3: pCR4-TOPO-3'HuNoV digerido com Pst1.

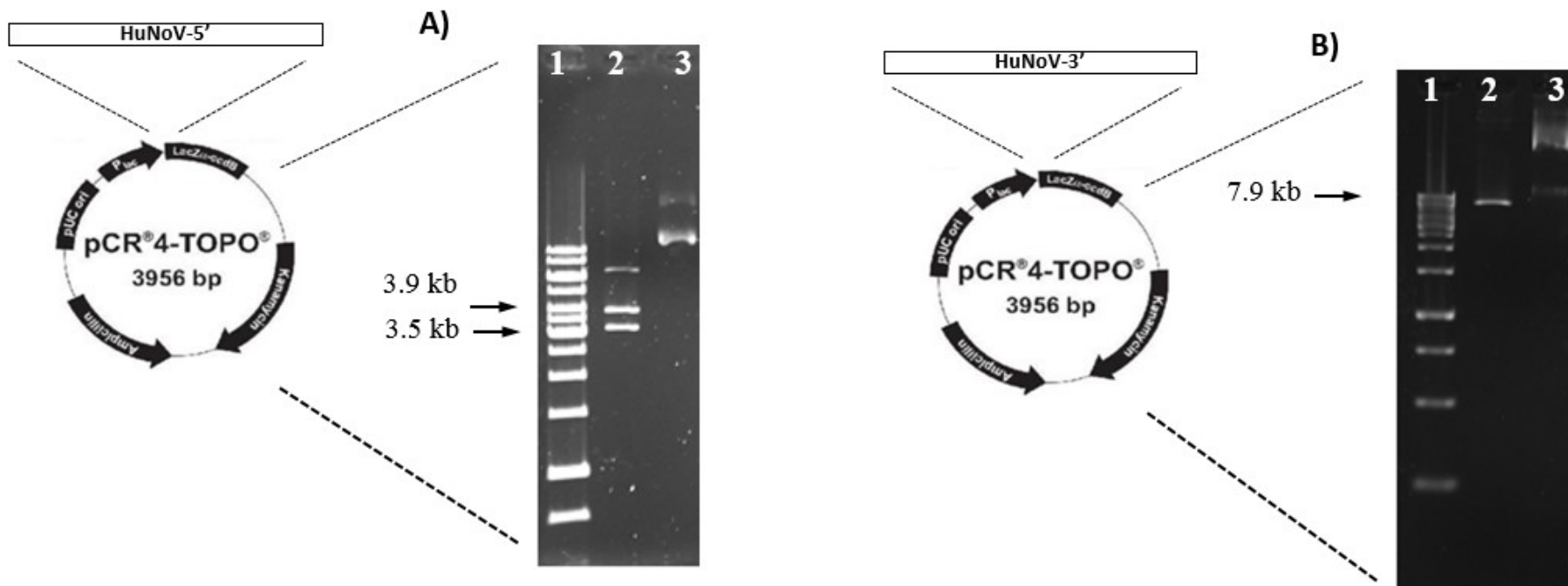


Figura 24: Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando perfil de enzimas de restrição dos clones HuNoV-666 em pCR4-3’HuNoV e pCR4-5’HuNoV com Eco RI e Pst1 respectivamente. A) Poço 1: Marcador de massa molecular 1 kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific), Poço 2: pCR4-TOPO-5’HuNoV digerido com Eco RI. Poço 3: pCR4-TOPO contendo o terminal 5’ do HuNoV-666 não digerido. B) Poço 1: Marcador de massa molecular 1 kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific). Poço 2: pCR4-TOPO-3’HuNoV-666 digerido com Pst1. Poço 3: pCR4-TOPO contendo o terminal 3’ do HuNoV-666 não digerido. Poço 3.

4.2 Análise filogenética das regiões de VP1 e RdRp das variantes do HuNoV GII.4

As árvores filogenéticas construídas foram baseadas na sequência nucleotídica dos genes inteiros da RdRp e VP1 e foram geradas pelo método *Neighbor-Joining*. A análise filogenética revelou que as sequências HuNoV-393 e HuNoV-666 foram agrupadas junto coma variante GII.4 Sydney 2012 (Fig. 25 e 26), concluindo que os dois isolados Brasileiros foram classificados como variante 2012 (Sydney). A análise de identidade realizada por Emboss Needle (Pairwise Sequence Alignment) mostrou que a sequência da VP1 de HuNoV-666 e HuNoV-393 possuíam 98,9% de identidade com a JX459908.1 Sydney e a sequência da RdRp de HuNoV-666 possuía 98.9% e HuNoV-393 possui 98.8% de identidade com a JX459908.1 Sydney, respectivamente.

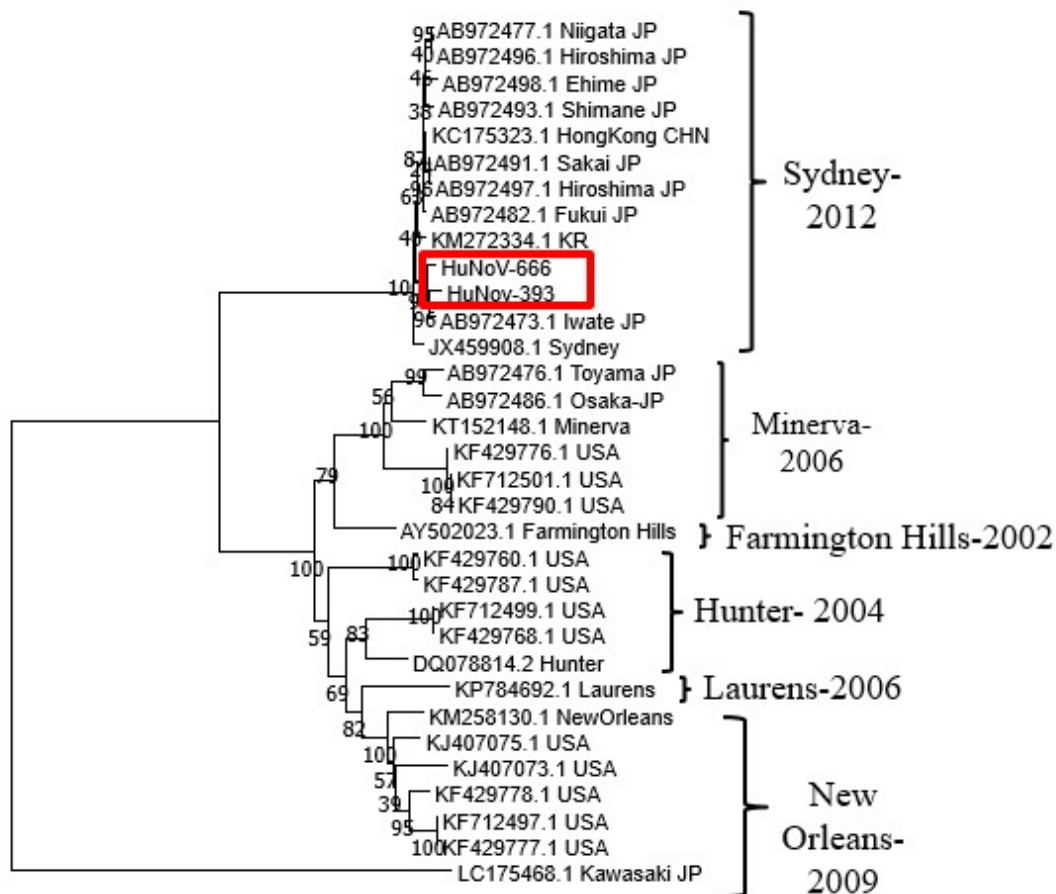


Fig 25: Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica da RdRp do HuNoV GII.4. A árvore foi construída baseada no método *Neighbor-Joining* usando o MEGA 7. Os valores do *Bootstrap* são mostrados nos nós das ramificações. As sequências obtidas nesse estudo são indicadas por uma caixa vermelha: HuNoV-393 e HuNoV-666. Os agrupamentos são correspondentes as variantes: Hunter-2004, Farmington Hills, Minerva-2006, Laurens 2006, New Orleans-2009 e Sydney-2012 e estão indicados por colchetes.

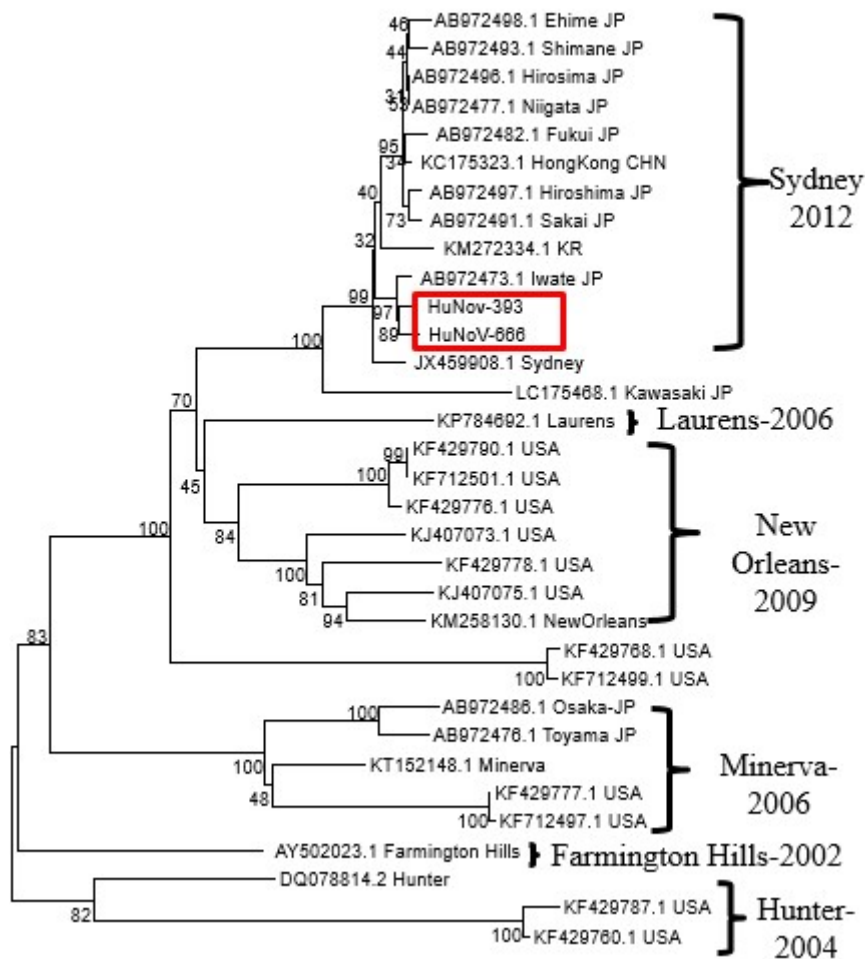


Fig 26: Árvore filogenética baseada na sequência da VP1 do HuNoV GII.4. A árvore foi construída baseada no método *Neighbor-Joining* usando o MEGA 7. Os valores do *Bootstrap* são mostrados nos nós das ramificações. As sequências obtidas nesse estudo são indicadas por uma caixa vermelha: HuNoV-393 e HuNoV-666. Os agrupamentos são correspondentes as variantes: Hunter-2004, Farmington Hills, Minerva-2006, Laurens 2006, New Orleans-2009 e Sydney-2012 e estão indicados por colchetes.

4.3 Montagem de clone infeccioso pHuNoV-Inf e replicon pHuNoV-GFP

A montagem completa do genoma do HuNoV-393 no vetor modificado pcDNA 3.1 ocorreu por meio da reação isotérmica *Gibson Assembly* e o plasmídeo recombinante foi selecionado pelo perfil de digestão gerado pela enzima de restrição NdeI (New England Biolabs). A figura 27 mostra dois clones pHuNoV-Inf que apresentaram perfil de enzimas de restrição esperado o qual foi confirmado a partir da presença dos fragmentos de 7 kb e 3,8 kb.

O replicon com GFP foi desenvolvido através da inclusão do gene GFP na construção pHuNoV-Inf entre os sítios de genes Helicase e p22 da poliproteína viral. Os clones que mostraram perfis esperados com a digestão com NdeI (Fig. 28) foram selecionados.

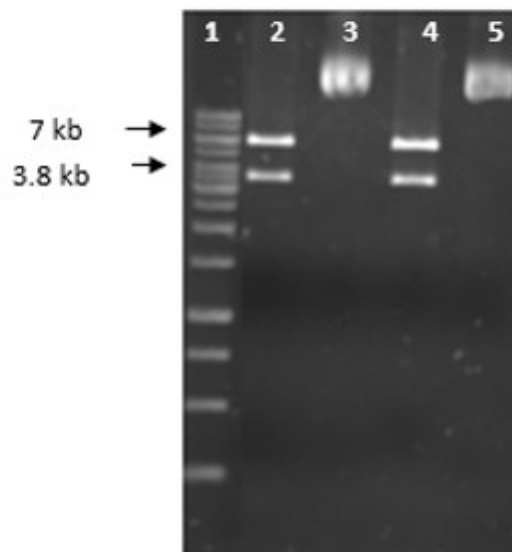
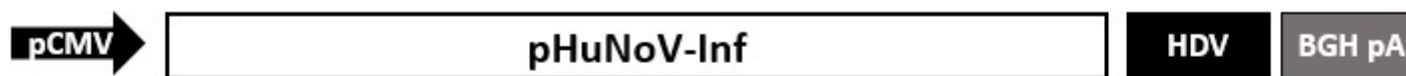


Figura 27: Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando perfil de enzima de restrição NdeI do clone infeccioso pHuNoV-Inf. Poço 1: Marcador de massa molecular 1kb DNA ladder (Thermo Scientific). Poço 2: Clone 3: Fragmentos de 7 kb e 3.8 kb correspondente a digestão com NdeI da construção pHuNoV-Inf (10.8kb). Poço3: Clone 3: DNA plasmidial pHuNoV-Inf não digerido. Poço 4; Clone 1: Fragmentos de 7 kb e 3.8 kb correspondente a digestão com NdeI da construção pHuNoV-Inf2012 (10.8kb). Poço 5: Clone 2: DNA plasmidial pHuNoV-Inf não digerido.

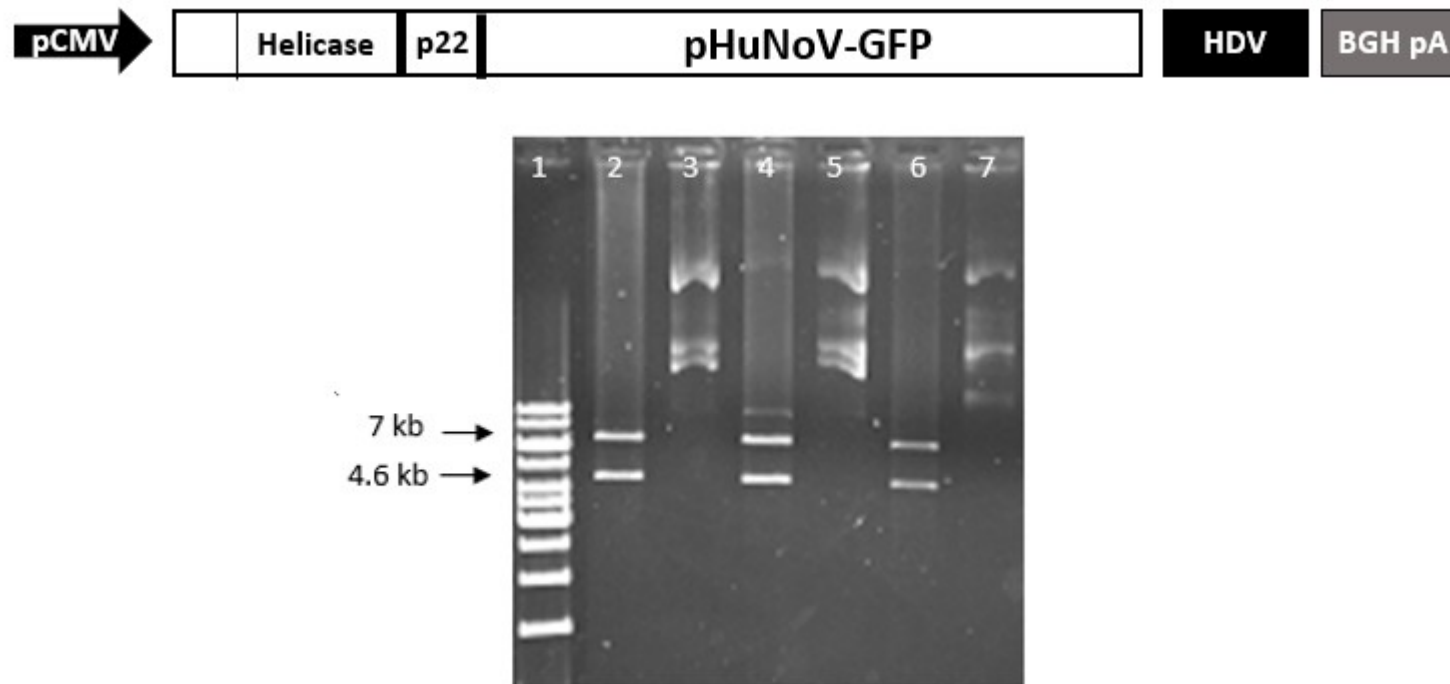


Figura 28: Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando perfil de enzima de restrição *Nde*I do pHuNoV-GFP. Poço 1: Marcador de massa molecular 1kb DNA ladder (Thermo Scientific). Poço 2: Clone 3: Fragmentos de 7 kb e 4.6 kb correspondente a digestão do pHuNoV-GFP com *Nde*I. Poço 3: DNA plasmidial do pHuNoV-GFP clone 3 não digerido. Poço 4: Clone 5: Fragmentos de 7 kb e 4.6 kb correspondente a digestão do pHuNoV-GFP com *Nde*I. Poço 5: DNA plasmidial do pHuNoV -GFP clone 5 não digerido. Poço 6: Clone 17: Fragmentos de 7 kb e 4.6 kb correspondente a digestão do pHuNoV -GFP com *Nde*I. Poço 7: DNA plasmidial do pHuNoV -GFP clone 17 não digerido.

4.4 Análise da expressão gênica do pHuNoV-Inf e pHuNoV-GFP e detecção da fita do RNA genômico senso negativo por *Northern blotting*

O genoma montado no vetor modificado pcDNA 3.1, pHuNoV-Inf e pHuNoV-GFP foram sequenciados. Nenhuma mutação de inserção/deleção ou códon de terminação não desejado foram encontrados.

A capacidade replicativa de pHuNoV-Inf, ou seja, de síntese da fita negativa do genoma foi indiretamente demonstrada pela detecção do produto da síntese do RNA subgenômico, a principal proteína do capsídeo VP1. O RNA subgenômico é sintetizado com molde da fita negativa do genoma e VP1 é sintetizado por RNA subgenômico. Portanto a presença da VP1 indica indiretamente a síntese da fita negativa do genoma do vírus, que é a fase inicial de replicação. Para avaliar a presença da VP1, as células transfectadas por pHuNoV foram analisadas por imunomarcação usando anticorpo policlonal para VP1. Sinais positivos usando o anticorpo policlonal para VP1 foram observados nas células transfectadas com pHuNoV-Inf mas não no controle negativo (Células não transfectadas) (Fig. 29). O pHuNoV-Inf produziu grande quantidade de VP1, e sua localização foi restrita ao citoplasma.

O pHuNoV-GFP replicon foi transfectado em células Caco-2. A produção de GFP foi visualizada em células vivas por microscopia confocal. As células foram processadas 24, 48, 72 h pt para imunomarcação utilizando anti-VP1. Os sinais do GFP foram observados tanto no núcleo quanto no citoplasma e as células transfectadas com pHuNoV-GFP foram distorcidas. O sinal do GFP foi mais forte a 24 h pt (Fig. 30). Os sinais positivos por imunomarcação usando anti-VP1 foi também observado pela microscopia confocal e indicou a sublocalização da VP1 na região perinuclear quando o replicon pHuNoV-GFP foi transfectado (Fig. 31).

A produção da fita negativa do genoma por resultado da replicação do genoma viral foi avaliada pelo método do *Northern blotting*. Esta técnica possibilita também a detecção do RNA subgenômico. O RNA total foi extraído das células a 24 e 48 h pt e 5 ug de RNA foi usado para a análise do *Northern blotting*. Uma sonda de RNA antisense foi usada para detectar o RNA subgenômico. Uma banda que migrou mais lentamente correspondente ao tamanho do RNA genômico de 7.6 kb foi detectado em células expressando pHuNoV-GFP e pHuNoV-Inf a 24 e 48 h pt (Fig. 32A). Outra banda

migrou um pouco acima de 2 kb, tamanho este equivalente ao RNA subgenômico (2,6 kb) e foi identificada em maior quantidade a 24 h. p.t tanto na construção pHuNoV-Inf quanto no replicon pHuNoV-GFP (Fig. 32A). Entretanto, este resultado faltou nitidez e precisa ser repetido.

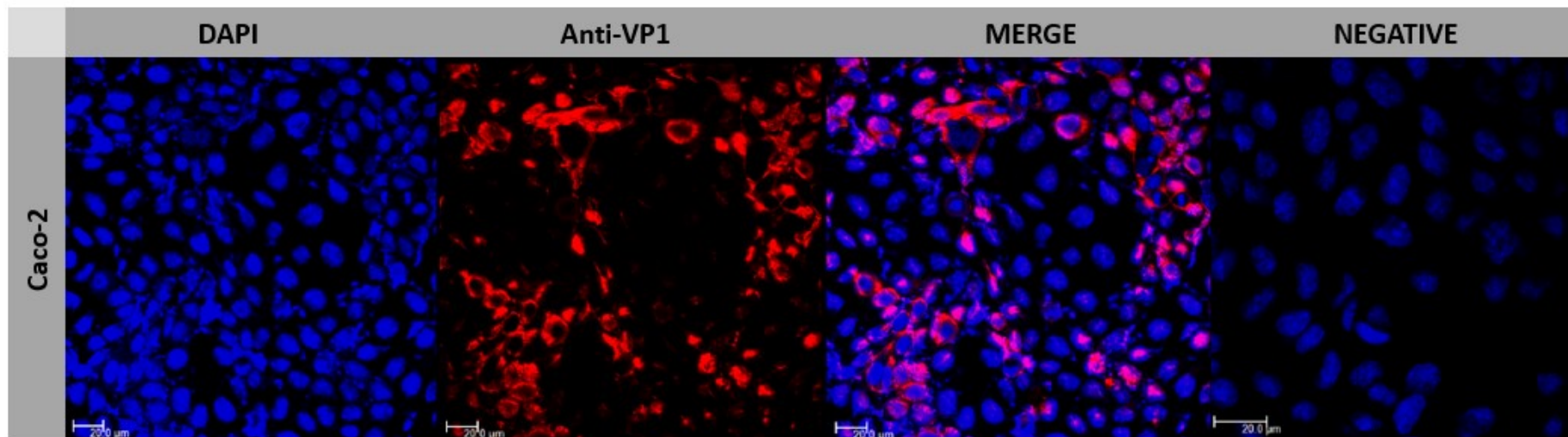


Figura 29: Microscopia confocal de células Caco-2 transfectada com pHuNoV-Inf a 48 h p.t. A proteína estrutural VP1 foram marcadas com o Alexa fluor 633 (vermelho) usando anti-VP1 como anticorpo primário. O núcleo foi marcado com DAPI (azul). O controle negativo (células não transfectadas) foi tratado pelo mesmo protocolo. Barras representa 20 µm

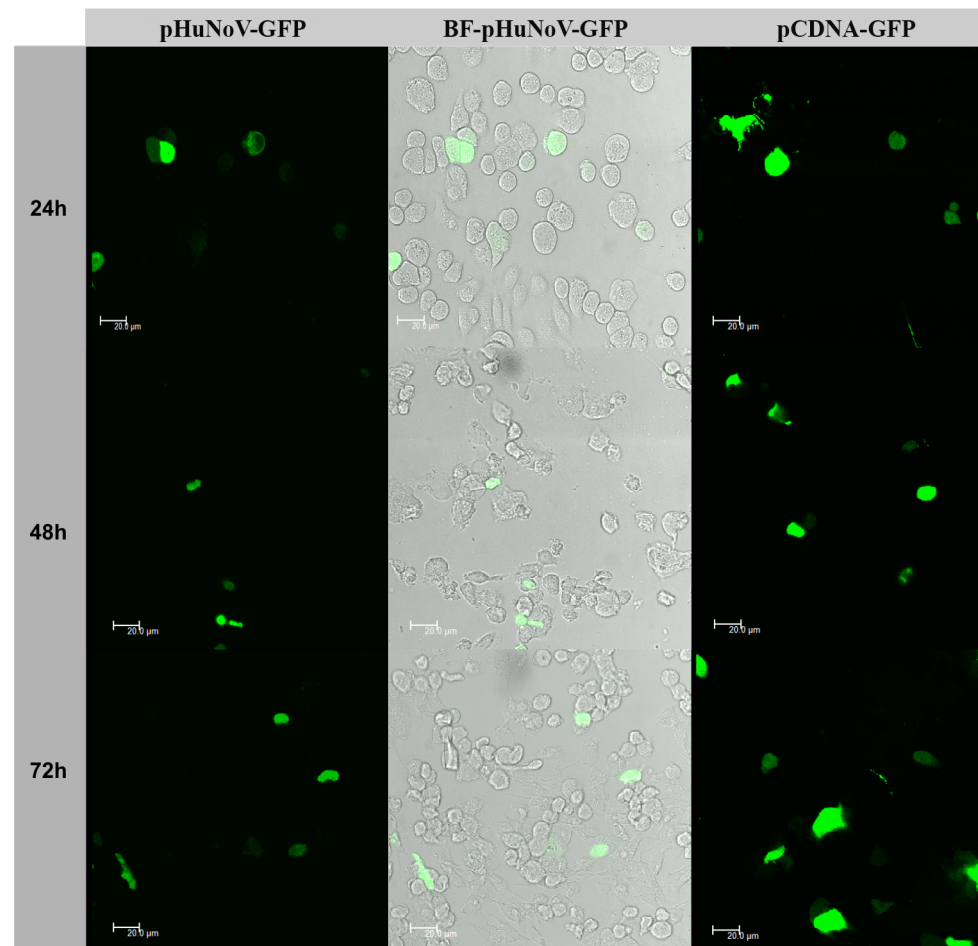


Figura 30: Microscopia confocal de células transfectadas com o replicon pHuNoV-GFP e do controle pCDNA-GFP. As imagens revelam a expressão do gene repórter, GFP, em células Caco-2 transfectadas a 24, 48 e 72 horas. Barras representam 20μm para todos os painéis.

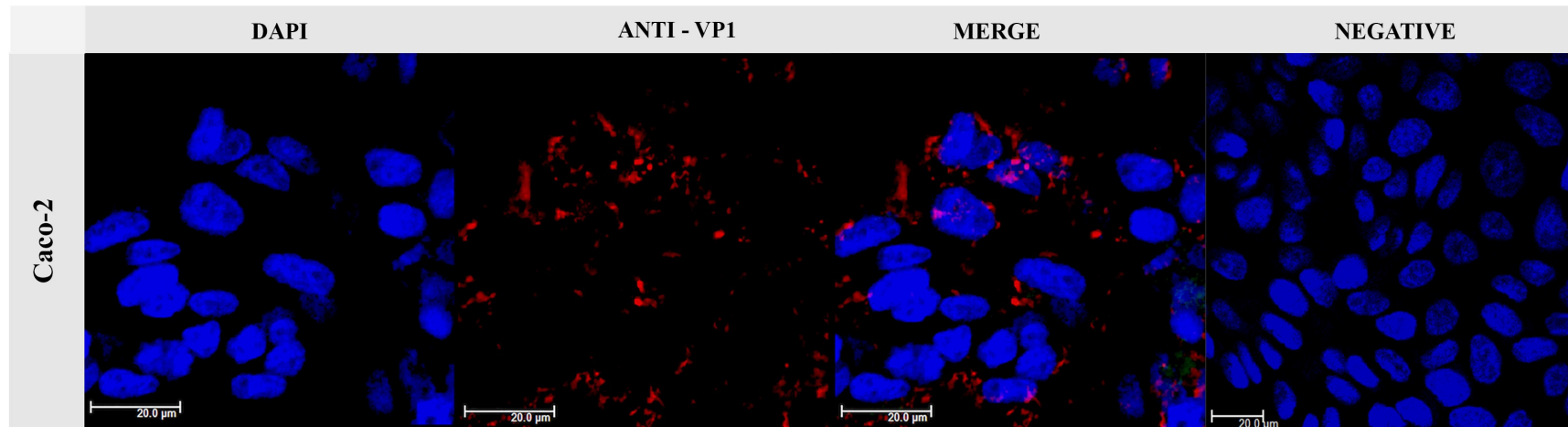


Figura 31: Microscopia de confocal do replicon pHuNoV-GFP transfectado em células caco-2 a 48 hpt. (DAPI): As células caco-2 foram coradas com DAPI (cor azul). (Anti-VP1): Os pontos em vermelho representam detecção da VP1. (MERGE): Mostra a sobreposição dos painéis DAPI e ANTI-VP1. (NEGATIVE) O controle negativo (células não transfectadas) foi tratado pelo mesmo protocolo. Barras representam 20μm

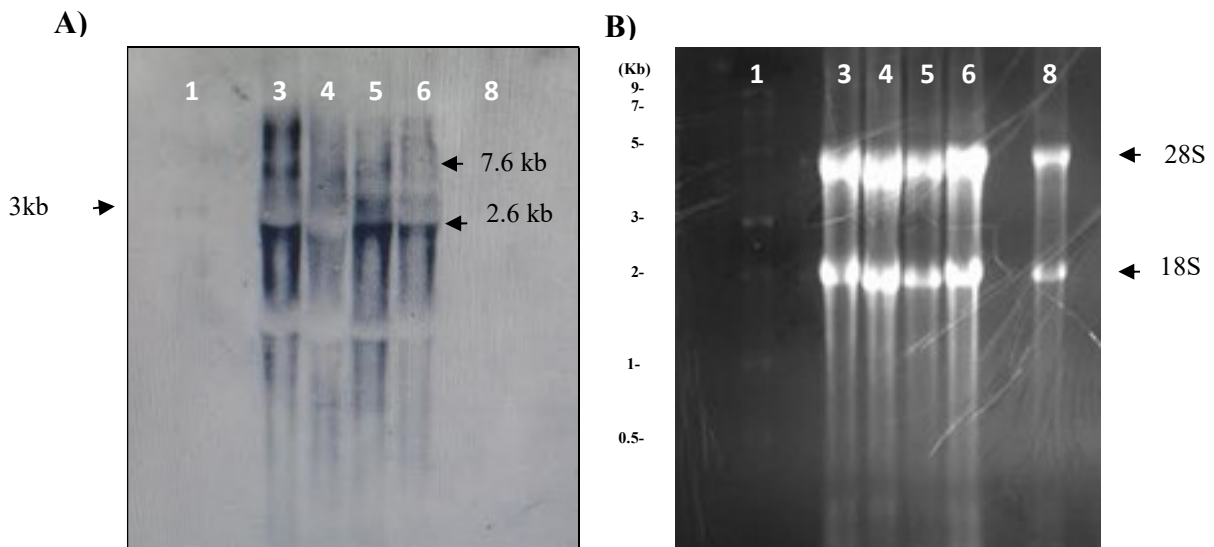


Figura 32: Detecção do fragmento genômico de HuNoV-2012 com as construções pHuNoV-GFP e pHuNoV-Inf em células Caco-2 a 24 e 48 h pt. A) Cada poço contém um total de 5µg de RNA. Poço 1: RNA ladder: ssRNA ladder (New England Biolabs). Poço 3: RNA de células transfectadas com a construção pHuNoV-Inf a 24 h pt. Poço 4: RNA de células transfectadas com a construção pHuNoV-Inf a 48 h pt. Poço 5: RNA de células transfectadas com a construção pHuNoV-GFP 24 h pt. Poço 6: RNA de células transfectadas com a construção pHuNoV-GFP 48 h pt. Poço 8: Controle negativo (células não transfectadas). B) Eletroforese do gel de RNA corado com brometo de etídeo. Poço 1: ssRNA ladder (NewEngland Biolabs). Linhas 3-6 e 8: demonstram a presença da subunidade 28S e 18S do RNA ribossomal.

4.5 Confirmação das clonagens dos genes Helicase e RdRp e expressão em células Caco-2

A inserção dos genes Helicase e RdRp clonados em pENTR 2B foram primeiramente confirmados através da análise dos perfis de enzima de restrição BamHI por eletroforese. Após a digestão com a BamHI, os fragmentos foram gerados: Helicase-N/C-terminal, 3.7 kb (Fig. 33) e RdRp- N/C-terminal, 4.2 kb (Fig. 34). As clonagens como a conservação do quadro de leitura foram confirmadas por sequenciamento.

A recombinação para o pcDNA modificado contendo os mGFP N/C-terminal e CFP N/C-terminal, foi posteriormente realizada e confirmada por sequenciamento.

A expressão em células transfectadas com as construções pcDNA-WGF2/FWG2-RdRp-C ou N-terminal e pcDNA-CWG2/Helicase-N foram visualizadas

por microscopia confocal. As células apresentaram morfologia distorcida após a transfecção e a fluorescência tanto das construções contendo o GFP quanto as que continham CFP exibiram uma distribuição difusa, apresentando uma localização tanto citoplasmática quanto nuclear (Fig. 35 e Fig. 36). Estes resultados corroboram com os encontrados por Katayama e colaboradores (2014), porém nesse trabalho a detecção da RdRp e outras proteínas não estruturais foi realizada em células transfectadas com o clone infeccioso, pHuNoV_{U201F}, ou seja, não houve interferência de nenhum gene repórter fusionado. A dupla localização observada no nosso estudo pode ser explicada pelo fato que o tamanho do eGFP estar dentro do limite de difusão passiva do complexo do poro nuclear, facilitando dessa maneira a entrada e saída do núcleo.

Nesse trabalho foi adotada a estratégia de clonar os genes Helicase e RdRp em ambas posições, N e C-terminal. Porém nossos resultados demonstraram que não houve diferença de expressão significativa entre a construção pcDNA-WGF2- RdRp-C e pcDNA-FWG2-RdRp N-terminal, já com a construção pcDNA-CWG2-Helicase-N, foi observado uma baixa expressão sendo necessário a realização de novos experimentos.

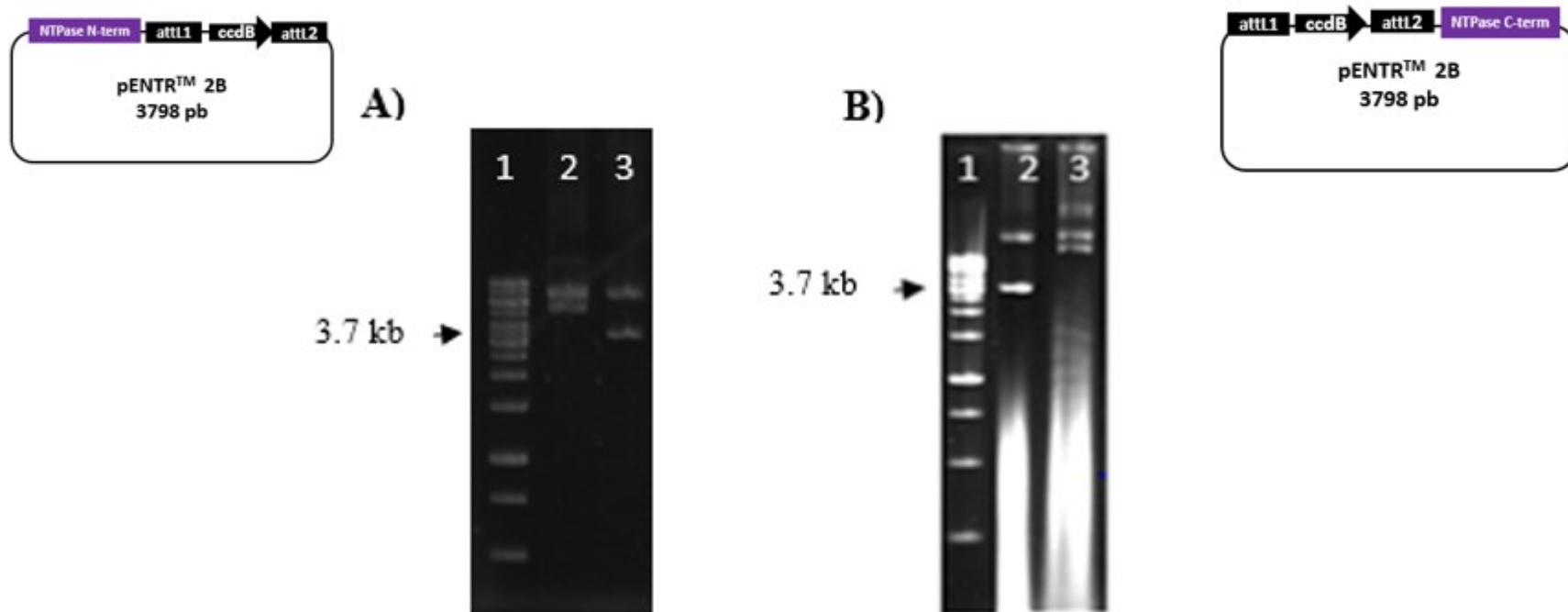


Figura 33: Eletroforese em gel de agarose 1%. Clonagem da Helicase N/C- terminal. A) Clonagem da Helicase-N-terminal em pENTR 2b. A) Poço 1: Marcador de massa molecular 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific). Poço 2: DNA plasmidial da construção pENTR-Helicase-N-terminal clone 11 não digerido. Poço 3: Digestão da construção pENTR-Helicase-N-terminal clone 11 com a enzima *BamHI* FD. B) Poço 1: Marcador de massa molecular 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific). Poço 2: Digestão da construção pENTR-Helicase-C-terminal clone 28 com a enzima *BamHI* FD. Poço 3: DNA plasmidial da construção pENTR-Helicase-C-terminal clone 28 não digerido.

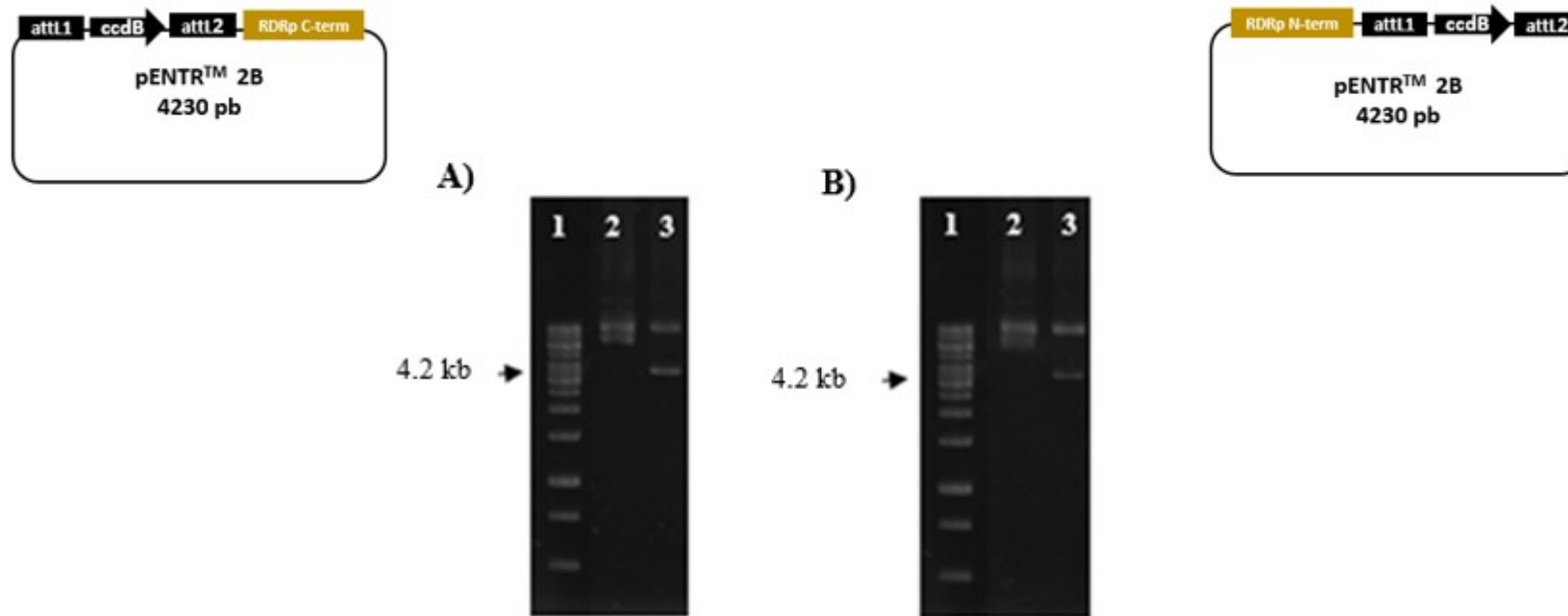


Figura 34: Eletroforese em gel de agarose 1%. Clonagem da RdRp C/N terminal em pENTR 2B. A) Clonagem da RdRp-C-terminal em pENTR 2b. A) Poço 1: Marcador de massa molecular 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific). Poço 2: DNA plasmidial da construção pENTR-RdRp-C-terminal clone 19 não digerido. Poço 3: Digestão da construção pENTR-RdRp-C-terminal clone 19 com a enzima BamHI FD. B) Poço 1: Marcador de massa molecular 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific). Poço 2: DNA plasmidial da construção pENTR-RdRp-N-terminal clone 29 não digerido. Poço 3: Digestão da construção pENTR-RdRp-N-terminal clone 29 com a enzima BamHI FD.

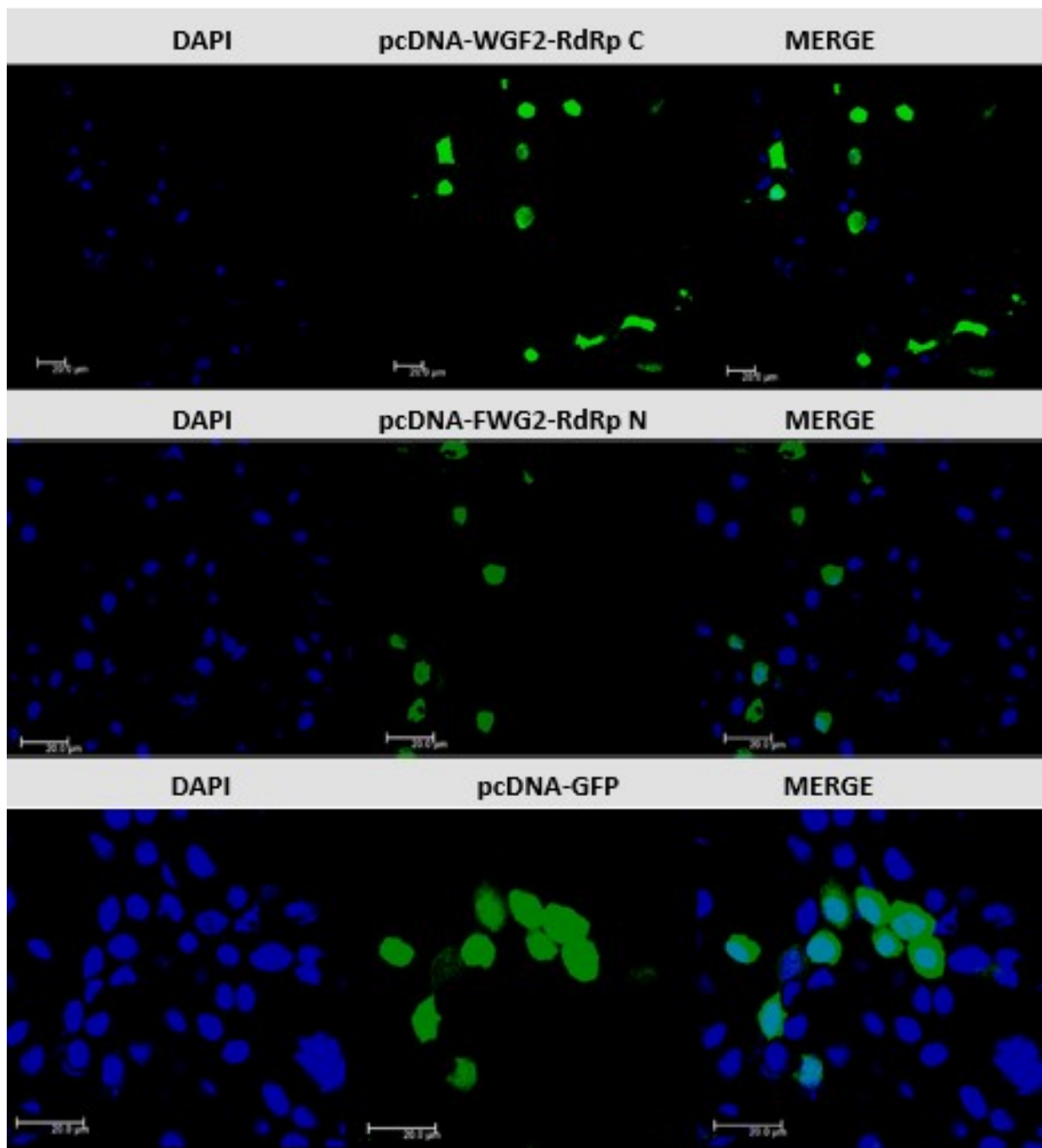


Figura 35: Microscopia confocal de células Caco-2 transfectadas com as construções: pcDNA-WGF2 - RdRp-C/N e o controle pcDNA-mGFP. Em azul: DAPI.

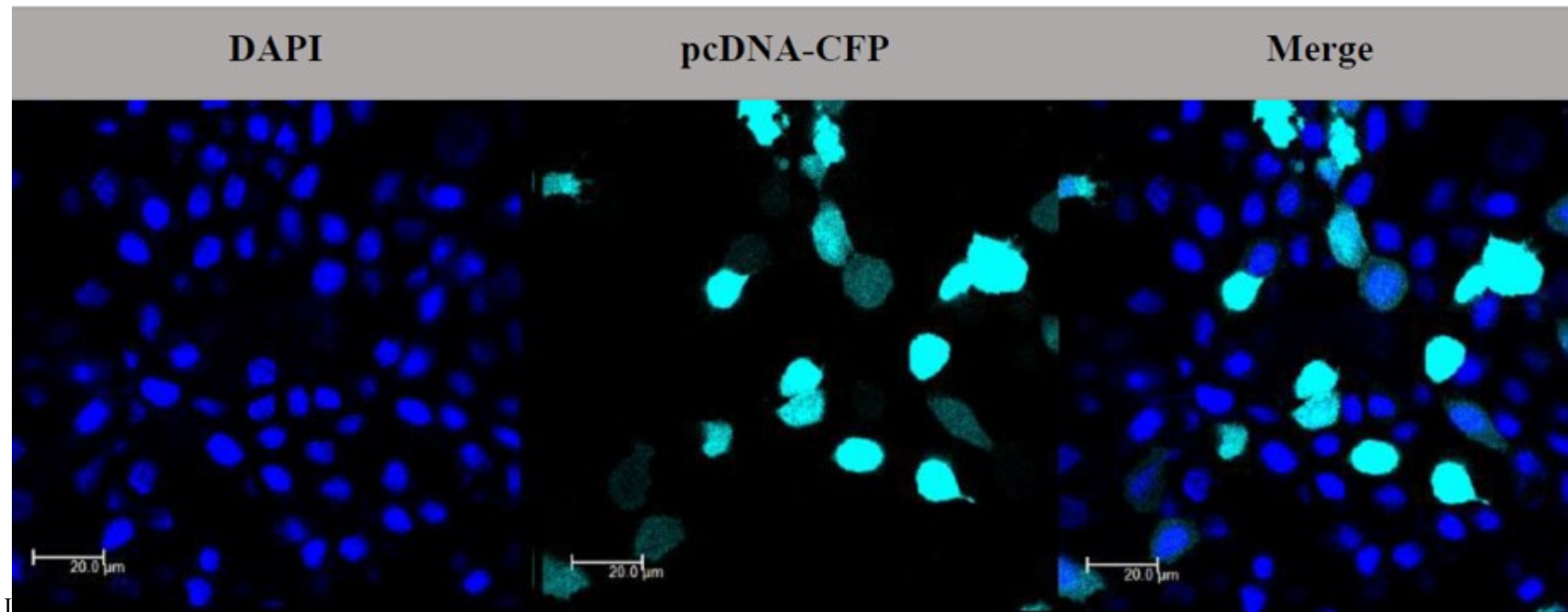


Figura 36: Microscopia confocal de células Caco-2 transfetadas com a construção controle: pcDNA-CFP. Em azul o DAPI.

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo foram sequenciados dois genomas completos de HuNoV GII.4. A análise filogenética foi realizada para avaliar o relacionamento genético entre os isolados obtidos e as variantes de GII.4. Como mostrado nas árvores filogenéticas ambas sequências, HuNoV-393 e HuNoV-666 foram classificadas como uma variante Sydney. No Brasil esta variante foi inicialmente detectada no nordeste, sudeste e sul em 2012 e substituiu a variante New Orleans-2009. Esta variante também tornou-se predominante nos EUA, Nova Zelândia, França, Japão e Hong Kong (Barclay *et al.* 2013, Bennett *et al.*, 2013, Chan e Chan 2013). Alguns estudos tem demonstrado que essa variante possui um potencial de substituição da variante e pode se diversificar dentro da população, o que contribui para a persistência da variante GII.4-Sydney na comunidade (Fonager *et al.*, 2013).

Adicionalmente o genótipo do norovírus da construção usada neste estudo é HuNoV GII.4-2012 Sydney. Este genótipo é ainda uma estirpe importante na Norovirologia. Neste estudo, nós construímos o clone infeccioso usando *Gibson Assembly* não inserindo nenhuma sequência não-viral adicional e o replicon com gene repórter GFP inserindo na ORF1 sem eliminar algum gene viral.

O *Gibson assembly* tem fornecido uma engenharia genética acessível na genética reversa viral. As estratégias de clonagem convencionais têm sido usadas como método de escolha para desenvolver clones infecciosos de HuNoV, porém o método convencional de clonagem baseada em enzimas de restrição tem grande desvantagem para inserir fragmentos grandes em vetor plasmidial. Além disso, o método convencional enfrentou as dificuldades devido as incompatibilidades de usar a enzima de restrição entre promotor e início de genoma viral.

Para a construção do clone infeccioso, pHuNoV-Inf, foi necessário a amplificação do genoma por PCR dividindo em dois fragmentos genômicos, pois várias tentativas sem sucesso foram realizadas para amplificar o genoma inteiro usando *primers* que visam os terminais 5' e 3'. Apesar dos segmentos genômicos e plasmídeos serem preparados em boas condições, a montagem do clone infeccioso, em muitos casos, resultam na recuperação do pcDNA sem o fragmento genômico de cDNA ou insertos truncados. A contaminação mínima do plasmídeo molde por usar a digestão com DpnI (que cliva sequência metilada que produtos de PCR não possui) após a preparação do fragmento de DNA ou reduzindo o plasmídeo molde pela amplificação

por ciclo rolante usando phi 29 DNA polimerase (resultando o aumento de quantidade do molde em forma linear) é uma boa alternativa.

Previamente a inserção do gene de resistência, neomicina, no gene VP1 de norovírus foi reportado por Chang e colaboradores (2006) e substituiu a parte principal da região VP1 para o gene neomicina. Esta construção é útil para o estudo da expressão gênica, mas não é ideal para estudar o ciclo de infecção dos norovírus. Neste estudo, o sítio de inserção da neomicina é a mesma posição como previamente descrito por Katayama e colaboradores (2014) na construção pHuNoV_{U201F-NTP/GFP/3A}, embora a sequência de aminoácido da clivagem da protease viral reconstruída seja diferente.

No estudo presente, nós descrevemos um clone infeccioso de HuNoV sobe o controle do promotor CMV. Katayama e colaboradores (2014) usou o promotor de mamífero EF-1 α para estabelecer replicons de HuNoV GII.3 uma vez que o uso do promotor CMV falhou. Embora em nosso estudo, o uso do promotor CMV não mostrou nenhum problema reconhecível. Esta diferença pode ser causada pela diferença da arquitetura na clonagem do clone infeccioso, especialmente na região genômica terminal 5'. O clone infeccioso desenvolvido por Katayama e colaboradores (2014) contém sequências não virais no terminal 5', mas em nosso caso, não existe sequência não viral adicionado pelo procedimento *Gibson Assembly*.

A condição para a geração de transcritos é que os terminais 5' e 3' do genoma de HuNoV estejam preservados. Para satisfazer essa exigência adotamos a estratégia de incluir a ribozima, hepatite delta no terminal 3' do genoma viral do clone infeccioso e replicon . Como já descrito por Chaudry e colaboradores (2007) a inclusão da ribozima no terminal 3' do genoma viral promove um aumento da produção viral e indica que o terminal 3' livre é exigido para que a replicação viral aconteça de modo eficiente.

Neste estudo nós modificamos o clone infeccioso com a inclusão do gene repórter, GFP. Quando os níveis de expressão de VP1 pelo clone infeccioso e replicon são comparados, o efeito desta inserção foi observado com uma redução do nível de expressão da VP1 por razões desconhecidas. Apesar do baixo nível, a expressão de VP1 na construção pHuNoV-GFP tinha uma capacidade de produzir fita negativa do genoma viral. Na análise por *Northern blotting* foi detectado uma banda correspondente ao tamanho do RNA genômico de 7.6 kb e outra de tamanho equivalente ao RNA subgenômico de 2.6 kb. Isto é um indicativo que a primeira etapa da replicação viral para produzir o RNA fita negativa por RdRp aconteceu. Isto mostrou que não apenas o

clone infeccioso pHuNoV-Inf, mas também o replicon com o gene repórter GFP pHuNoV-GFP poderão ser ferramentas para estudar os estágios iniciais da replicação.

Várias tentativas sem sucesso foram realizadas afim de reduzir os sinais do *Northern blotting* por meio do tratamento com DNase, porém novos experimentos são necessários.

A genética reversa permite realizar aplicações importantes para o estudo de questões relacionadas a biologia viral. Entre suas possíveis aplicações estão a mutagêneses sítio-dirigida que pode contribuir tanto para a interrupção do gene quanto para identificação de aminoácidos importantes para a função proteica, silenciamento gênico e interferências usando transgenia (Bayou, 2017).

A produção de vírus quimeras, já foram empregados para o sistema de genética reversa dos FCV e confirmou a associação da região hipervariável E com a formação da estrutura antigênica do virion (Neill *et al.*, 2000). Esta aplicação contribuiu para a produção de estirpes vacinais derivadas do clone de cDNA.

Outra aplicabilidade, também estabelecido para FCV, utilizou para avaliar o papel dos fatores celulares hospedeiros no ciclo de vida viral. Nesse estudo foi possível identificar dois sítios de ligações na PTB nos primeiros 250 nucleotídeos do genoma de FCV (correspondente a região codificante na poliproteína viral). Análises posteriores indicaram que mutações nos dois sítios de ligações da PTB reduziu a ligação ao genoma viral, porém não foi interrompida inteiramente devido a necessidade de manter a capacidade de codificação dessa região do RNA viral (Karakasiliotis *et al.*, 2010).

Outro exemplo, foi o sistema de recuperação do MNV baseado em pol-II o qual demonstrou ser essencial para a clivagem proteolítica entre a protease e a polymerase da ORF-1 (Ward *et al.*, 2007). A identificação de estruturas de RNA exigidas para a replicação de MNV também tem sido utilizada como aplicação para o sistema de genética reversa dos MNV. Algumas análises do genoma viral permitiu identificar em regiões codificantes do genoma viral estruturas de RNA. O sistema de genética nesse caso foi usado para introduzir mutações que interrompessem a formação dessas estruturas. No genoma dos MNV essas estruturas se localizavam no terminal 5' e 3'. As mutações no terminal 5' eram mais debilitantes do que letais, enquanto que no terminal 3' eram letais (Simmonds *et al.*, 2008).

Com o intuito de estudar o sítio de replicação viral, nesse trabalho também foram estudadas duas proteínas envolvidas na replicação viral. Os genes que codificam as proteínas helicase/Helicase e RdRp foram clonados na posição N-terminal e C-

terminal do vetor pcDNA CWG2/WC2 (contendo eCFP) e pcDNA FWG2/WGF2 (contendo eGFP) respectivamente.

As células transfectadas com as construções pcDNA-WGF2/FWG2-RdRp-C ou N-terminal e pcDNA-CWG2/Helicase-N exibiram uma localização citoplasmática e nuclear. Nós sabemos que a construção pcDNA-WGF2/FWG2-RdRp-C/N-terminal possui massa molecular de 82 kDa e pcDNA-CWG2/Helicase-N-terminal 67 kDa e que tem sido acreditado que o tamanho máximo da proteína para difundir através do poro nuclear é de 60 kDa. Porém, Wang e colaboradores (2007) demonstraram que proteínas com tamanho de 90 a 110 kDa se difundem através do poro nuclear, o que contradiz a visão a longo prazo do limite máximo estabelecido de 60 kDa.

Comparativamente não foi possível observar diferenças significativas de expressão entre a construção pcDNA-WGF2-RdRp C-terminal e pcDNA-FWG2-RdRp N-terminal, já com a construção pcDNA-CWG2/Helicase-N-terminal, foi observado uma baixa expressão. Esta redução pode estar relacionada com o dobramento da estrutura terciária da proteína de interesse e possivelmente houve interferência com o sinal do CFP. Em razão dessa variação de expressão nesse trabalho foi adotado a estratégia de clonagem com fusão de proteína fluorescente em ambas posições, C e N-terminal.

Experimentos adicionais serão necessários para confirmar a co-localização das proteínas helicase/Helicase e RdRp com o marcador NBD C6-ceramide (Invitrogen), para a pesquisa da localização no complexo de Golgi ou marcador pcDNA-RFP com sinal de localização para o retículo endoplasmático.

6. PERSPECTIVA

No que se refere a obtenção do clone infeccioso e o replicon de HuNoV GII.4-2012, a principal continuidade a ser testada é a pesquisa do sítio de replicação viral que poderá ser realizada inicialmente com a co-localização do anticorpo dsRNA com o marcador pcDNA-RFP contendo sinal de localização para o retículo endoplasmático. Caso a presença das duas marcações seja observada em locais distintos, marcações específicas para outras organelas celulares serão avaliadas como para a pesquisa da localização no complexo de Golgi com o marcador NBD C6-ceramide (Invitrogen).

No intuito de confirmar os sítios de replicação novos ensaios serão realizados para a expressão em células transfectadas com as construções pcDNA-WGF2-RdRp-C e

pcDNA-WGC2/Helicase-C. O aparelho de Golgi será marcado com marcador NBD C6-ceramide (Invitrogen) ou o retículo endoplasmático com o marcador pcDNA-RFP.

Uma vez confirmado o sítio de replicação viral pretende-se identificar a proteína do retículo endoplasmático ou aparelho de Golgi que apresenta afinidade com a Helicase ou RdRp do vírus para isso será empregada a metodologia de *pull-down*. A partir dessa informação será realizado o *knock-down* do gene hospedeiro utilizando a construção de shRNA (*short hairpin* RNA) ou CRISPR/Cas9 com o objetivo de impossibilitar o sucesso da infecção viral, oferecendo dessa forma uma excelente estratégia antiviral que poderá contribuir futuramente para a redução dos casos de gastroenterite aguda.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahmed, S.M; Hall, A.J; Robinson, A.E, *et al.*, 2014. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 14,725-730.
2. Alhatlani, B; Vashist, S; Goodfellow, I., 2015. Functions of the 5' and 3' ends of calicivirus genomes. *Virus Res* 206, 134-143.
3. Arias, A; Bailey, D; Chaudhry, Y; Goodfellow, I., 2012. Development of a reverse-genetics system for murine norovirus 3: long-term persistence occurs in the caecum and colon. *J. Gen. Virol.* 93, 1432–1441.
4. Asanaka, M; Atmar, R.L; Ruvolo, V; *et al.*, 2005. Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 10327–10332.
5. Baltimore, D., 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226,1209–11.
6. Barclay, L; Wikswo, M; Gregoricu, N; Vinjé, J., *et al.*, 2013. Emergence of new norovirus strain GII.4 Sydney-United States, 2012. *Morb Mortal Wkly Rep* 62, 55.
7. Bayou Kibruyesfa., 2017. Current Techniques and Applications of Reverse Genetics: An Overview. *Genetics* 7, 31-37.
8. Belov, G.A. & van Kuppeveld, F.J.M., 2012. (+) RNA viruses rewire cellular pathways to build replication organelles. *Curr Opin Virol* 2, 740–747.
9. Bennett, S; MacLean, A; Miller, R.S., *et al.*, 2013. Increased norovirus activity in Scotland in 2012 is associated with the emergence of a new norovirus GII.4 variant. *Euro Surveill* 18, e20349.
10. Bernard, P; Couturier, M., 1992 Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J.Mol. Biol* 226, 735-745.
11. Bertolotti-Ciarlet, A.L.J; White, R; Chen, B.V., *et al.*, 2002. Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *J.Virol* 76, 4044-4055.
12. Black, D.N; Burroughs, J.N; Harris, T.J.R *et al.*, 1978. The structure and replication of calicivirus RNA. *Nature* 274, 614-615.

13. Bull, R.A.E.T; Tu, C. J; McIver, W.D., *et al.*, 2006. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J.Clin. Microbiol.* 44,327-333.
14. Chang, K.O; Sosnovtsev, S.V; Belliot, G., *et al.*, 2005. Reverse genetics system for porcine enteric calicivirus, a prototype sapovirus in the Caliciviridae. *J. Virol* 79, 1409–1416.
15. Chang, K.O; Belliot, G; King, A.D., *et al.*, 2006. Stable expression of a Norwalk virus RNA replicon in a human hepatoma cell line. *Virol.* 353, 463–473.
16. Chang, K.O; George, D.W., *et al.*, 2007. Bile acids promote the expression of hepatitis C virus in replicon-harboring cells. *J.Virol.*81, 9633-9640.
17. Chan, M.C; Chan, P.K., 2013. Complete genome sequence of a novel recombinant human norovirus genogroup II genotype 4 strain associated with an epidemic during summer of 2012 in Hong Kong. *Genome Announc.* 1: e00140-12.
18. Chaudhry, Y; Nayak, A; Bordeleau, M.E; *et al.*, 2006. Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components. *J.Biol.Chem.* 281, 25315–25325.
19. Chaudhry, Y; Skinner, M.A. Goodfellow, I.G., 2007. Recovery of genetically defined murine norovirus in tissue culture by using a fowlpox virus expressing T7 RNA polymerase. *J. Gen.Virol.* 88, 2091–2100.
20. Chhatwal, P; Bankwitz, D; Gentzsch, J., *et al.*, 2012. Bile acids specifically increase hepatitis C virus RNA-replication. *PlosOne.* 7, e36029.
21. Chiba, S; Nakata, S; Numata-Kinoshita., *et al.*, 2000. Sapporo virus: history and recent findings. *J. Infec. Dis.* 181, 303-308.
22. Clarke, I.N; Green, K.Y; Hansman, G.S., *et al.*, 2012. Caliciviridae. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier Academic Press, London, 977–986.
23. Cohen, S.N; Chang, A.C; Boyer, H.W., *et al.*, 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.*70,3240-3244.
24. Conley, M; Emmott, E; Orton., R; *et al.*, 2017. Taylor D, Carneiro DG, Murata K, Goodfellow IG, Hansman GS, Bhella D. Vesivirus 2117 capsids more closely

- resemble sapovirus and lagovirus particles than other known vesivirus structures. *J Gen Virol.* 98:68–76.
25. Cubitt, W.D; Blacklow, N.R; Herrmann, J.E.; *et al.*, 1987 Antigenic relationships between human caliciviruses and Norwalk virus. *J.Infect. Dis.* 156, 806-813.
 26. Dicaprio, E; Ma, Y; Hughes, J; *et al.*, 2013. Epidemiology, prevention, and control of the number one foodborne illness: human norovirus. *Infect Dis Clin North Am.* 27,651-74.
 27. Doerflinger, S.Y; Cortese, M., Romero-Brey, I., *et al.*, 2017. Membrane alterations induced by nonstructural proteins of human norovirus. *PLoS Pathog.*13, e1006705.
 28. Donaldson, E.F; Lindesmith, L.C; Lobue, A.D., *et al.*, 2008. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol. Rev.* 225,190-211.
 29. Duizer, E; Schwab, K.J, Neill, F.H., *et al.*, 2004. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J Gen Virol.* 85, 79–87.
 30. Ettayebi, K; Crawford, S.E; Murakami, K., *et al.*, 2016: Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science.* 353, 1387–93.
 31. Firth, A.E. & Brierley, I., 2012. Non-canonical translation in RNA viruses. *J Gen Virol* 93, 1385–1409.
 32. Flynn, W.T., Saif, L.J., Moorhead, P.D., 1988. Pathogenesis of porcine enteric calicivirus-like virus in four-day-old gnotobiotic pigs. *Am. J. Vet. Res.* 49 (6), 819–825.
 33. Flint, S.J, Enquist, L.W; Racaniello, V.R., *et al.*, 2008. *Principles of Virology*, 3 ed, vol 1. AMS Press.
 34. Fonager, J; Hindbak, L.S; Fischer, T.K., *et al.*, 2013. Rapid emergence and antigenic diversification of the norovirus 2012 Sydney variant in Denmark, October to December, 2012. *Euro Surveill* 18: 20413.
 35. Fumian, T.M; Andrade, J.S.R; Leite, J.P.G *et al* 2016. Norovirus recombinant strains isolated from gastroenteritis outbreak in Southern Brazil, 2004-2011. *PLoS ONE* 11, e0145391.
 36. Goodfellow, I; Chaudry, Y; Gioldase, I., *et al.*, 2005. Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF4E. *Embo Rep* 6: 968-972. *EMBO Rep* 6, 968–972.

37. Green, K.Y, Ando, T; Balayan, M.S., *et al* 2000. Taxonomy of the Calicivirus. *J Infect Dis* 181, 322-3330.
38. Guix, S; Asanaka, M; Katayama, K., *et al* 2007. Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells. *J Virol.* 81, 12238-12248.
39. Gutierrez-Escolano, A.L; Brito, Z.U; Del Angel, R.M., *et al.*, 2000. Interaction of cellular proteins with the end of Norwalk virus genomic RNA. *J Virol.* 74, 8558–8562.
40. Hansman, G.S; Natori, K; Shirato-Horikoshi, H.; *et al.*, 2006. Genetic and antigenic diversity among noroviruses. *J. Gen. Virol.* 87, 909-19.
41. Hartley, J.L; Temple, G. F; Brasch, M.A., 2000. DNA cloning using in vitro sitespecific recombination. *Genome Res.* 10, 1788-1795.
42. Hennechart-Collette, C; Martin-Latil, S; Guillier.; *et al.*, 2015. Determination of which virus to use as a process control when testing for the presence of hepatitis A virus and norovirus in food and water. *Int.J.Food Microbiol.* 202, 57-29.
43. Herbst-Kralovetz, MM, Radtke AL, Lay MK, *et al.*, 2013 Lack of norovirus replication and histo-blood group antigen expression in 3-dimensional intestinal epithelial cells. *Emerg Infect Dis.* 19, 431–438.
44. Jiang, X; Wang, M; Wang, K., *et al.*, 1993. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 195, 51-61.
45. Jiang, X., Wilton, N., Zhong, W.M., *et al.*, 2000. Diagnosis of human caliciviruses by use of enzyme immunoassays. *J. Infect. Dis.* 181, S349–S359.
46. Jones, M.K; Watanabe, M; Zhu, S., *et al.*, 2014. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science* 346, 755–759.
47. Jones, M.K; Grau, K.R; Costantini, V., *et al.*, 2015: Human norovirus culture in B cells. *Nat Protoc.* 10, 1939–1947.
48. Kapikian, A.Z.; Wyatt, R.G; Dolin, R.; *et al.*, 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J.Virol.* 10, 1075-1081.
49. Karst, S.M; Zhu, S; Goodfellow, I.G., 2015. The molecular pathology of noroviruses. *J Pathol.* 235, 206-216.
50. Karakasiliotis, I; Vashist, S.; Bailey, D.; *et al.*, 2010. Polypyrimidine tract binding protein functions as a negative regulator of feline calicivirus translation. *PLoS One.* 5: e9562.

51. Katayama, K; Murakami, K; Sharp, T.M., *et al.*, 2014. Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, E4043-E4052.
52. Katsafanas, G.C. and Moss B., 2007. Colocalization of transcription and translation within cytoplasmic poxvirus factories coordinates viral expression and subjugates host functions. *Cell Host Microbe* 2, 221–228.
53. Kim, H.Y; Cho, H.K; Choi, Y.H., *et al.*, 2010. Bile acids increase hepatitis B virus gene expression. And inhibit interferon-alpha activity. *FEBS.J.* 277, 2791-2802.
54. King, A; Adams, M.J, Carstens, E.B; Lefkowitz E (eds) (2012). *Virus taxonomy. Ninth Report of the International Committee on taxonomy of viruses.* Elsevier-Academic Press, Amsterdam, 987–1001.
55. Kirkwood, C. D.and Streitberg, R., 2008. Calicivirus shedding in children after recovery from diarrhoeal disease. *J.Clin.Virol.* 43, 346–348.
56. Koopmans, M., 2008. Progress in understanding norovirus epidemiology. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21, 544–552.
57. Kroneman, A.H; Vennema, J; Harris, G.; *et al.*, 2006. Increase in norovirus activity reported in Europe. *Euro. Surveill.*11, 3093.
58. Kroneman, A; Veja, E; Vennema, H., *et al.*, 2013. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol.* 10, 2059-2068.
59. Kumar, S; Stecher, G; Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870-1874.
60. Landy, A., 1989. Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda Site-specific Recombination. *Annu.Rev.Biochem.* 58, 913-949.
61. Lay, M.K., Atmar, R.L., Guix, S., *et al.*, 2010. Norwalk virus does not replicate in human macro-phages or dendritic cells derived from the peripheral blood of susceptible humans. *Virol. J.* 406, 1–11.
62. Liu, Y; Wimmer, E; Paul, A.V., 2009. Cis-acting RNA elements in human and animal plus-strand RNA viruses. *Biochim Biophys Acta.* 1789, 495–517.
63. Lopman, B.A, Reacher, M.H, Vipond, I.B., *et al.*, 2004. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. *Clin Infect Dis.* 39, 318–24.

64. Mabbott, N.A; Donaldson, D.S; Ohno, H.; *et al.*, 2013. Microfold (M) cells: Important immune surveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol.* 6, 666–677.
65. Martin, D.P., 2009. Recombination detection and analysis using RDP3. *Methods Mol Biol.* 537, 185–205.
66. McFadden, N; Bailey, D; Carrara, G., *et al.*, 2011. Norovirus regulation of the innate immune response and apoptosis occurs via the product of the alternative open reading frame 4. *PLoS Pathog* 7, e1002413.
67. Mercer, J; Schelhaas, M; Helenius, A., 2010: Virus entry by endocytosis. *Annu Rev. Biochem.* 79, 803–833.
68. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde; 2010.
69. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância e saúde. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, DF, Departamento de vigilância das doenças transmissíveis, 2017.
70. Ministério da Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil 1999 – 2004. *Boletim Eletrônico Epidemiológico*, Brasília, DF, n. 6, p. 1, 2005.
71. Morotti, R.A.; Kaufman, S.S.; Fishbein, T.M.; *et al.*, 2004. Calicivirus infection in pediatric small intestine transplant recipients: Pathological considerations. *Hum. Pathol.* 35, 1236–1240.
72. Naphine, S; Lever, R.A; Powell, M. L., *et al.*, 2009. Expression of the VP2 protein of murine norovirus by a translation termination-reinitiation strategy. *PLoS ONE* 4, e8390.
73. Neill, J. D.; Sosnovtsev, S. V.; Green, K. Y., 2000. Recovery and altered neutralization specificities of chimeric viruses containing capsid protein domain exchanges from antigenically distinct strains of feline calicivirus. *J.Virol.* 74: 1079–1084.
74. Ohlinger, V.F; Haas, B; Meyers, G., *et al.*, 1990. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *Journal of Virology.* 64, 3331-3336.

75. Papafragkou, E; Hewitt, J, Park, G.W., *et al.*, 2013. Challenges of culturing human norovirus in three-dimensional organoid intestinal cell culture models. PLoSOne. 8, e63485.
76. Parra, G.I; Green, K.Y 2015. Genome of Emerging Norovirus GII.17, United States, 2014. *Emerg Infect Dis.* 21, 1477-1479.
77. Paul, A.V; Wimmer, E., 2015. Initiation of protein-primed picornavirus RNA synthesis. *Virus Res.* 206, 12-26.
78. Ptashne, M.A., 1992. *Genetic Switch: Phage and Higher Organisms.* Cambridge, MA: Cell Press.
79. Perry, J.W; Taube, S; Wobus, C.E., 2009. Murine norovirus-1 entry into permissive macrophages and dendritic cells is pH-independent. *Virus Res.* 143, 125–129.
80. Perry, J.W; Wobus, C.E., 2010. Endocytosis of murine norovirus 1 into murinemacrophages is dependent on dynamin II and cholesterol. *J Virol.* 84, 6163–6176.
81. Prasad, B.V; Rothnagel, R; Jiang, X., *et al.*, 1994. Three dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J Virol.* 68, 5117–5125.
82. Pybus O.G; Rambaut, A; Belshaw, R., *et al.*, 2007. Phylogenetic evidence for deleterious mutation load in RNA viruses and its contribution to viral evolution. *Mol Biol Evol.* 24, 845-852.
83. Racaniello, V., & Baltimore, D., 1981. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science*, 214, 916-919.
84. Rohayem, J; Robel, I, Ja"ger, K., *et al.*, 2006. Protein-primed and de novo initiation of RNA synthesis by norovirus 3D pol. *J Virol.* 80, 7060–7069.
85. Royall, E; Locker, N., 2016. Translational control during calicivirus infection. *Viruses* 8, 104-117.
86. Sambrook, J. & Russel, D.W., 2001. *Molecular Cloning.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
87. Sandoval-Jaime, C.; Green, K.Y; Sosnovtsev, S.V., 2015. Recovery of murine norovirus and feline calicivirus from plasmids encoding EMCV IRES in stable cell lines expressing T7 polymerase. *J.Virol.Methods* 217, 1–7.
88. Scallan, E; Hoekstra, R.M; Ângulo, F.J., *et al.*, 2011. Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens. *Emerg Infect Dis.* 17, 7-15.

89. Scholtes, C; Diaz, O; Icard, V., *et al.*, 2008. Enhancement of genotype 1 hepatitis C virus replication by bile acids through FXR. *J.Hepatol.* 48, 192-199.
90. Shivanna, V; Kim, Y; Chang, K.O., 2014. The crucial role of bile acids in the entry of porcine enteric calicivirus. *Virology*.0, 268–278.
91. Shivanna, V; Kim, Y; Chang, K.O., 2015. Ceramide formation mediated by acids phingomyelinase facilitates endosomal escape of caliciviruses. *Virology*. 483, 218–28.
92. Siebenga, J; Kroneman, A; Vennema, H., *et al.*, .2008. Food-borne viruses in Europe network report: the norovirus GII.4 2006b (for US named Minerva-like, for Japan Kobe034-like, for UK V6) variant now dominant in early seasonal surveillance. *Euro Surveill*.13, 8009.
93. Simmonds, P; Karakasiliotis, I; Bailey, D., *et al.*, 2008. Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. *Nucleic Acids Res* 36, 2530–2546.
94. Straub, T.M; Honer, Z.B.K; Orosz, C.P., *et al.*, 2007. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerg Infect Dis* 13, 396-403.
95. Sosnovtsev, S.V; Belliot, G, Chang, K., *et al.*, 2005. Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *J Virol* 79, 4012–4024.
96. Strong, D.W., Thackray, L.B., Smith, T.J., Virgin IV, H.W., 2012. Protruding domain of capsid protein is necessary and sufficient to determine murine norovirus replication and pathogenesis in vivo. *J. Virol.* 86, 2950–2958.
97. Subba-Reddy, C.V; Goodfellow, I; Kao, C.C., 2011. VPg-primed RNA synthesis of norovirus RNA-dependent RNA polymerases by using a novel cell-based assay. *J. Virol.* 85, 13027–13037.
98. Takanashi, S; Saif, L.J; Hughes, J.H., *et al.*, 2014. Failure of propagation of human norovirus in intestinal epithelial cells with microvilli grown in threedimensional cultures. *Arch Virol.* 159, 257–266.
99. Taniguchi, T; Palmieri, M; Weissmann, C., *et al.*, 1978. A Qbeta DNA-containing hybrid plasmid giving rise to Qbeta phage formation in the bacterial host. *Annales de microbiologie*, 129, 535-536.
100. Taube, S; Jiang, M; Wobus, C.E., 2010. Glycosphingolipids as receptors for non-enveloped viruses. *Viruses.* 2, 1011–49.

101. Thanh, H.D; Than, V.T; Nguyen, T.H., *et al.*, 2016. Emergence of Norovirus GII.17 variants among children with acute gastroenteritis in South Korea. PloS ONE 11, e0154284.
102. Thorne, L.G; Goodfellow, I., 2013. Norovirus gene expression and replication. J.Gen.Virol. 95, 278-291.
103. Thumfart, J.O; Meyers, G., 2002. Feline calicivirus: recovery of wild-type and recombinant viruses after transfection of cRNA or cDNA constructs. J.Virol. 76, 6398-6407.
104. Temin, H.M; Mizutani, S., 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. Nature 226, 1211–13.
105. Unicef, WHO. 2009. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done, New York.
106. Vashist, S; Bailey, D; Putics, A., *et al.*, 2009. Model systems for the study of human norovirus biology. Future Virol 4, 353–367.
107. Vashist, S., Urena, L; Chaudhry, Y., *et al.*, 2012. Identification of RNA–protein interaction networks involved in the norovirus life cycle. J Virol 86, 11977–11990.
108. Villanueva, R.A; Rouille, Y; Dubuisson, J., 2005. Interactions between virus proteins and host cell membranes during the viral life cycle. Int. Rev. Cytol. 245, 171–244.
109. Vinje, J; Altena, S; Koopmans, M., 1997. The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. J. Infect. Dis. 176, 1374-1378.
110. Vongpunsawad, S., B. V. Venkataram Prasad, and M. K. Estes. 2013. Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain. J Virol 87:4818-4825.
111. Wang, R; Brattain, M.G., 2007. The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa. FEBS letters. 581, 3164-3170.
112. Ward, V.K., McCormick, C.J., Clarke, I.N., *et al.*, 2007. Recovery of infectious murine norovirus using pol II-driven expression of full-length cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 11050–11055.
113. Widdowson, M.A; Cramer, E.H; Hadley, L., *et al.*, 2004. Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus—United States, 2002. J. Infect. Dis. 190:27-36.

114. Wikan, N; Smith, D.R., 2016. Zika vírus: history of a newly emerging arbovirus. *Lancet. Infect. Dis.*16: e119-e126.
115. Wobus, C.E; Karst, S.M; Thackray, L.B., *et al.*, 2004. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropismo for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol* 2, e432.
116. Yamashita, T; Ito, M; Tsuzuki, H., *et al.*, 2001. Sakae K. Identification of Auchi virus infection by measurement of immunosorbent assay. *J.Clin.Microbiol.* 39, 4178-4180.
117. Zahorsky, J., 1929. Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease. *Arch.Pediatr.* 46,391-395.
118. Zamore, P., Tuschl, T., Sharp, P., *et al.*, 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell.* 10, 25–33.

8. APÊNDICE



Development of an infectious clone and replicon system of norovirus GII.4

Oliveira L.M.^{a,b}, Blawid R.^a, Orílio A.F.^a, Andrade B.Y.G.^a, Souza A.C.A.^c, Nagata T.^{a,b,*}



^a Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

^b Pós-graduação em Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

^c Engenharia de Bioprocessos e de Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, TO, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Norwalk virus
Caliciviridae
Full-length cDNA clone
Seamless cloning

ABSTRACT

Human norovirus (HuNoV) is one of the main causes of acute gastroenteritis worldwide and is responsible for at least 20% of all cases. The detailed molecular mechanism of this norovirus remains unknown due to the lack of a suitable *in vitro* culturing system. An infectious clone of HuNoV would be a useful tool for elucidating the processes of viral infection and the mechanisms of replication. We developed an infectious cDNA clone of HuNoV using the rapid technique of Gibson Assembly. The complete genome of the HuNoV GII.4 Sydney subtype was cloned into a previously modified pcDNA3.1-based plasmid vector downstream from a cytomegaloviral promoter. We monitored the viral infection *in vitro* by inserting the reporter gene of the green fluorescent protein (GFP) between the NTPase and p22 genes, also by Gibson Assembly, to construct a HuNoV-GFP replicon. Human Caco-2 cells were transfected with the full-length genomic clone and the replicon containing GFP. The gene encoding the VP1/VP2 capsid protein was expressed, which was indirect evidence of the synthesis of subgenomic RNAs and thus the negative strand of the genome. We successfully constructed the infectious clone and its replicon containing GFP for the HuNoV GII.4 Sydney subtype, a valuable tool that will help the study of noroviral infection and replication.

Human norovirus (HuNoV) is a common name of *Norwalk virus* in the genus *Norovirus* of the *Caliciviridae* family and was discovered more than four decades ago (Kapikian et al., 1972). Its replication cycle and host pathogenesis remain unclear due to the lack of an appropriate cell-culture system for viral growth and purification (Karst, 2016; Kocher and Yuan, 2015; Royall et al., 2015). The development of effective therapeutics has consequently been delayed. This technical difficulty has increased the demand to develop and use an infectious norovirus cDNA clone for basic studies in viral gene expression and replication.

Infectious cDNA clones of positive-sense RNA viruses are an indispensable tool for experimental virology (Yamshchikov et al., 2001; Siridechadilok et al., 2013). The development of infectious clones, however, is laborious because of the multiple and difficult cloning steps in constructing vector plasmids. Some technical concerns such as plasmid copy number per cell, choice of bacterial host strain, incubation temperature, insert size, intron addition and selected promoter types strongly influence the construction of infectious clones (Aubry et al., 2015).

The most common approach for developing infectious clones of RNA viruses is the insertion of full-length viral cDNA controlled by the T7 or other bacterial or bacteriophage-based RNA polymerase promoters, adding a restriction enzyme site at the 3' end for run-off *in vitro*

transcription (Beckert and Masquida, 2011). Producing infectious RNA by this strategy often requires adding the cap analog in *in vitro* transcription, even though the virus uses a strategy of cap-independent translation (Huang and Yu, 2013). *In vitro* transcription, however, is both laborious and inefficient for viral recovery (Aubry et al., 2015).

Another approach for developing infectious cDNA of positive-stranded RNA viruses is using a eukaryotic-recognizable promoter instead of a bacterial promoter, usually with terminator and/or ribozyme sequences at the 3' end. The cDNA of the viral genome is introduced with this strategy directly into the host cells without *in vitro* transcription. Viral transcripts generated *in vivo* act as messenger RNA and are able to produce viral proteins (Xia et al., 2006).

Despite its advantages, this strategy has some technical concerns, such as difficulties encountered in seamless cloning between a eukaryotic promoter and the 5' end of the viral genome or between the 3' end and the terminator or ribozyme sequences. The instability of vector plasmids with large inserts is also a problem for this strategy (Tuo et al., 2015).

We report the development of an infectious cDNA clone of the HuNoV GII.4 Sydney subtype (2012) and its replicon containing the GFP reporter gene under the control of the cytomegaloviral (CMV) promoter, a common mammalian promoter. The seamless technique of

* Corresponding author at: Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, 70910-900, DF, Brazil.
E-mail address: tatsuya@unb.br (T. Nagata).

Gibson Assembly can bypass conventional cloning and dramatically accelerate the development of infectious clones of RNA viruses. Our results demonstrate a simple, rapid and effective procedure that can be applied to studies of HuNoV gene expression and replication.

An isolate of the HuNoV GII.4 Sydney subtype was provided by the Fundação Osvaldo Cruz (kindly provided by Dr. Tulio M. Fumian, IOC/FIOCRUZ, Brazil) as a stool sample. RNA was extracted using the ZR Soil/Fecal RNA Microprep™ kit (Zymo Research, Irvine, USA), and cDNA was synthesized at 47 °C using SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) with the oligodT50-M4 reverse primer (Table S1). The cDNA was then amplified by PCR to produce two fragments (5' and 3' regions) using LongAmp Taq DNA Polymerase (New England BioLabs, Ipswich, USA). The primers HuNoV 5 Forward and HuNoV 3571 Reverse were used to amplify the 5' region, and the primers HuNoV 3510 Forward and M4 anchor Reverse (Table S1) were used to amplify the 3' region. The amplicons of the 5' and 3' regions were gel-purified using the illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Lifesciences, Chicago, USA) and cloned into the pCR4-TOPO vector (Thermo Fisher Scientific) using the TOPO TA Cloning Kit for Sequencing. The *Escherichia coli* DH10B strain was transformed with the constructs and cultured at 37 °C, and the sequences of the plasmids were confirmed by Sanger sequencing by Macrogen Inc. (Seoul, South Korea).

The full-length viral genome was then assembled by amplifying the two genomic regions (5' and 3' regions) and the plasmid vector backbone (modified pcDNA3.1) using Phusion High-Fidelity DNA polymerase (New England BioLabs). The Neomycin resistance gene was removed by PCR to reduce the plasmid size using the primers pcDNA-Del Neo Forward and pcDNA-Del Neo Reverse (Table S1) that annealed adjacent to the Neomycin resistance gene. The plasmid was circularized using polynucleotide kinase and T4 DNA ligase (New England BioLabs) and was then transformed into the *E. coli* DH10B strain, producing the pcDNA3.1 Del-Neo construct. The plasmid sequence was confirmed, and the ribozyme sequence from Hepatitis Delta virus (HDV) was then added by PCR to the pcDNA3.1 Del-Neo plasmid using the primers HDV_pcDNA Forward and CMV Reverse (Table S1). The plasmid was sequenced and named pcDNA-DelNeo-Rz. The 5' and 3' fragments of the viral genome were amplified with an overlap of 15 nt in the central region of the genome using the primer pairs CMV-5 Forward and HuNoV 5 Reverse and HuNoV 3 Forward and OligodT50-Ribo Reverse (Table S1), respectively (Fig. 1A). pcDNA-DelNeo-Rz was amplified using the primers HDV Forward and CMV Reverse (Table S1). The three amplified fragments were gel-purified and assembled in an isothermal reaction at 50 °C for 2 h using Gibson Assembly Cloning Master Mix (New England Biolabs). The molecular ratio of the vector plasmid to the 5' and 3' insert fragments for the reaction was 1:2:2 (100:160:160 ng). The solution of the Gibson Assembly procedure was then dialyzed on a nitrocellulose membrane (MF-Membrane Filters VSWP, 0.25 µm; Merck Millipore, Billerica, USA) onto Milli-Q water (Merck Millipore) for 15 min, and *E. coli* DH10B was transformed with the construct. The transformed *E. coli* were incubated at 28 °C for all culturing steps to reduce the risk of undesired mutations (mainly deletions) during culturing. The plasmid sequence was confirmed by Macrogen Inc. (South Korea) by Sanger sequencing, and the plasmid was named pHuNoV-Inf.

The GFP reporter gene was incorporated into the replication polyprotein gene using Gibson Assembly for a simpler recognition of infection. The reporter gene was inserted between the NTPase and p22 genes, reproducing the cleavage sites by the viral protease (YELQ/GPED) adjacent to the eGFP gene (Fig. 1B). The eGFP gene was amplified using the primers eGFP Forward and eGFP Reverse (Table S1). The selected pHuNoV-Inf clone was used as a template for backbone preparation, and the protease cleavage sites were added by PCR in primer sequences using the primers HuNoV N-terminal Reverse and C-terminal Forward (Table S1). All fragments were purified using the GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Lifesciences), and selected plasmids were cloned using Gibson Assembly, sequenced by Macrogen

Inc. (Seoul Korea) and named pHuNoV-GFP.

The cloning of pHuNoV-Inf was confirmed by Sanger sequencing, and the construct (1 µg) was transfected into colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells using Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) in a 24-well plate containing RPMI 1640 medium without phenol red (Thermo Fisher Scientific). The cells were incubated at 37 °C for 48 h, fixed with 3% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde for 10 min and then permeabilized by Triton X-100 (0.2% diluted in 1 × PBS) for 20 min at room temperature. The transfected cells were then blocked with 1 × PBS containing 3% BSA for 20 min. Polyclonal antiserum against NoV GII.4 VLPs (Lamounier et al., 2015) obtained by the intraperitoneal immunization of BALB/c mice (kindly provided by Dr. Lucimeire Antonelli da Silveira, Universidade Federal de Goiânia, Brazil) was diluted 1:100 was added and incubated for 2 h. The cells were incubated for 1 h with anti-mouse secondary antibodies conjugated with the Alexa Fluor 633 fluorophore (1:500) (Thermo Fisher Scientific). Nuclei were stained with a solution of 10 µM DAPI for 10 min. All incubation steps were carried out at room temperature, and the cells were rinsed three times with 1 × PBS. The processed cells were analyzed with a TCS-SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

The pHuNoV-GFP replicon and the control construct, i.e. the pcDNA plasmid containing the eGFP gene (pcDNA-GFP), were transfected into the Caco-2 cells as described above. GFP production was observed by laser confocal microscopy (Leica TCS-SP5) 24, 48 and 72 h post-transfection (p.t.). The Caco-2 cells transfected with the pHuNoV-GFP replicon were immunolabeled using a polyclonal antibody against the noroviral VLPs (anti-VLPs) as described above.

The assembled genome in the modified pcDNA 3.1 vector, pHuNoV-Inf and pHuNoV-GFP were sequenced. No important in/del mutations or undesired stop codons were found.

The replicative capacity of pHuNoV-Inf was indirectly demonstrated by detecting the product of subgenomic RNA synthesis, the major capsid protein VP1 and/or minor capsid protein VP2. To confirm whether VP1/VP2 was successfully produced, we analyzed the transfected cells by immunostaining using a polyclonal antibody against VLPs (anti-VLPs). Positive signals using the anti-VLPs were observed in the cells transfected with pHuNoV-Inf but not the negative control (Fig. 2). pHuNoV-Inf produced high amount of VP1/VP2, which was restricted to the cytoplasm.

The pHuNoV-GFP replicon and the control plasmid pcDNA-GFP were transfected into Caco-2 cells. GFP production was visualized in live cells by confocal microscopy. Cells were processed 24, 48 and 72 h p.t. for immunolabeling. The GFP signals were not restricted to the cytoplasm, but observed in the entire cell. Mainly, the cells transfected with pHuNoV-GFP were distorted. The GFP signal reached a maximum at 24 h p.t. (Fig. 3A). Positive signals by immunolabeling using anti-VLPs were also observed in the cells transfected with pHuNoV-GFP 48 h p.t. The signals for VP1/VP2 observed by confocal microscopy indicated the sublocalization of VP1/VP2 in the perinuclear region when the pHuNoV-GFP replicon was transfected (Fig. 3B).

Gibson Assembly provides accessible genetic engineering in the reverse genetics of RNA viruses. We tried conventional cloning strategies to develop the HuNoV infectious clone for more than six months but without success. The construction of pHuNoV-Inf required dividing the genome into two fragments (the 5' and 3' regions) for PCR amplification, because numerous attempts to amplify the entire viral genome using primers that targeted the 5' and 3' ends were unsuccessful. The recovery of input pcDNA to use as PCR template without cDNA insertion was often another difficulty. Minimizing the contamination of the template plasmid by digestion with DpnI restriction endonuclease after preparation of the DNA fragment or by reducing the circular form of the template plasmid by rolling-circle amplification using phi 29 DNA polymerase are also recommended.

We describe the construction of an infectious clone of HuNoV under the control of the CMV promoter. Katayama et al. (2014) used the EF-

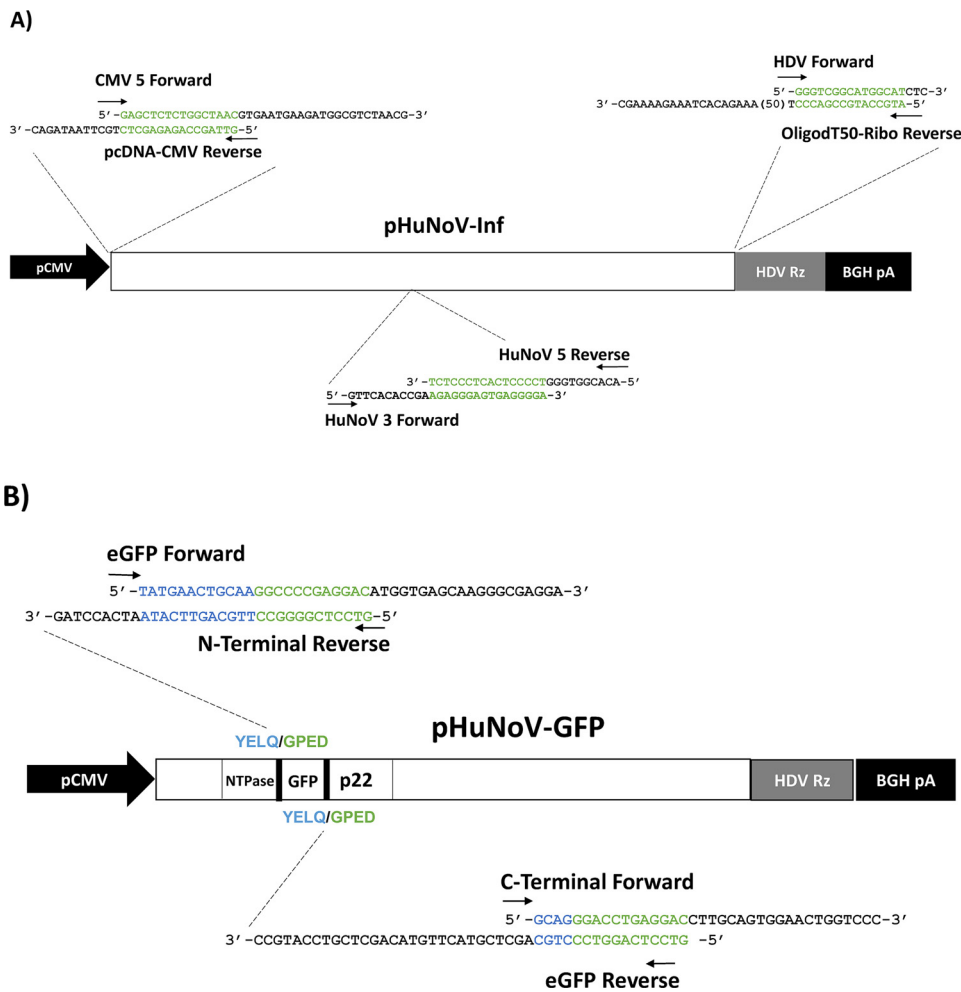


Fig. 1. Strategy for the construction of the infectious clone pHuNoV-Inf (A) and the replicon pHuNoV-GFP (B) by one-step seamless cloning - Gibson Assembly. Primers containing overlapping sequences (green and blue colored) were used for preparing the norovirus cDNA fragments and the vector backbone. The vector pcDNA-DelNeo-Rz contains the following elements: CMV promoter (pCMV), ribozyme (HDV-Rz) and bovine growth hormone polyadenylation signal (BGH pA). Two proteolytic cleavage sites, YELQ/GPED, were introduced (added in the primers) in the construct pHuNoV-GFP at the C-terminus of NTPase and at the N-terminus of p22 (B) (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

1 α mammalian promoter to construct replicons of HuNoV GII.3, because the use of the CMV promoter failed. The use of the CMV promoter in our study, however, did not present any recognizable problems. These differences may have been caused by the different architectures of the infectious clones, especially at the 5' end of the genomic region. The infectious clone developed by Katayama et al. (2014) contained 107 nt of non-viral sequence at the 5' end, but our pHuNoV-Inf clone using Gibson Assembly had no additional non-viral sequence.

The insertion of the GFP gene in the noroviral VP1 gene has been previously reported (Chang et al., 2006, Katayama et al., 2014), whereby a major part of the VP1 region was replaced by the GFP gene.

This construction is useful for studies of gene expression but may not be ideal for studying the infection cycle of the norovirus. The insertion site of GFP in our study was the same as previously described by Katayama et al. (2014) for the pHuNoV_{U201F-NTP/GFP/3A} construct, although the amino acid sequences of the reconstructed viral protease cleavage sites differed.

We modified the infectious clone by including the GFP reporter gene. This insertion decreased the amount of VP1/VP2 accumulated in the cells transfected with the replicon relative to those transfected with the infectious clone, by an unknown mechanism. The production of VP1/VP2 by the pHuNoV-GFP construct, even though lower, was

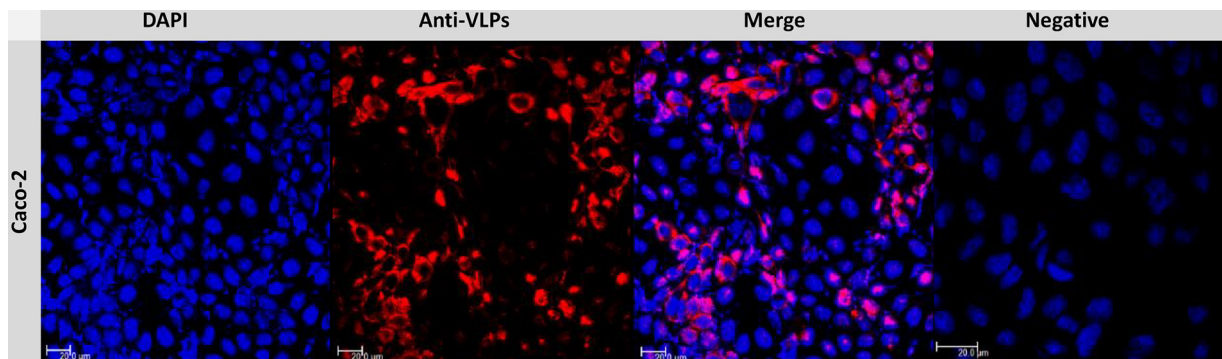


Fig. 2. Confocal microscopy micrographs of Caco-2 cells transfected with pHuNoV-Inf at 48 h p.t. The structural VP1/VP2 proteins were labeled with Alexa Fluor 633 (red) using polyclonal anti-VLPs as the primary antibody. The nuclei were stained with DAPI (blue color). The negative control was treated by the same protocol. Bars represent 20 μ m (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

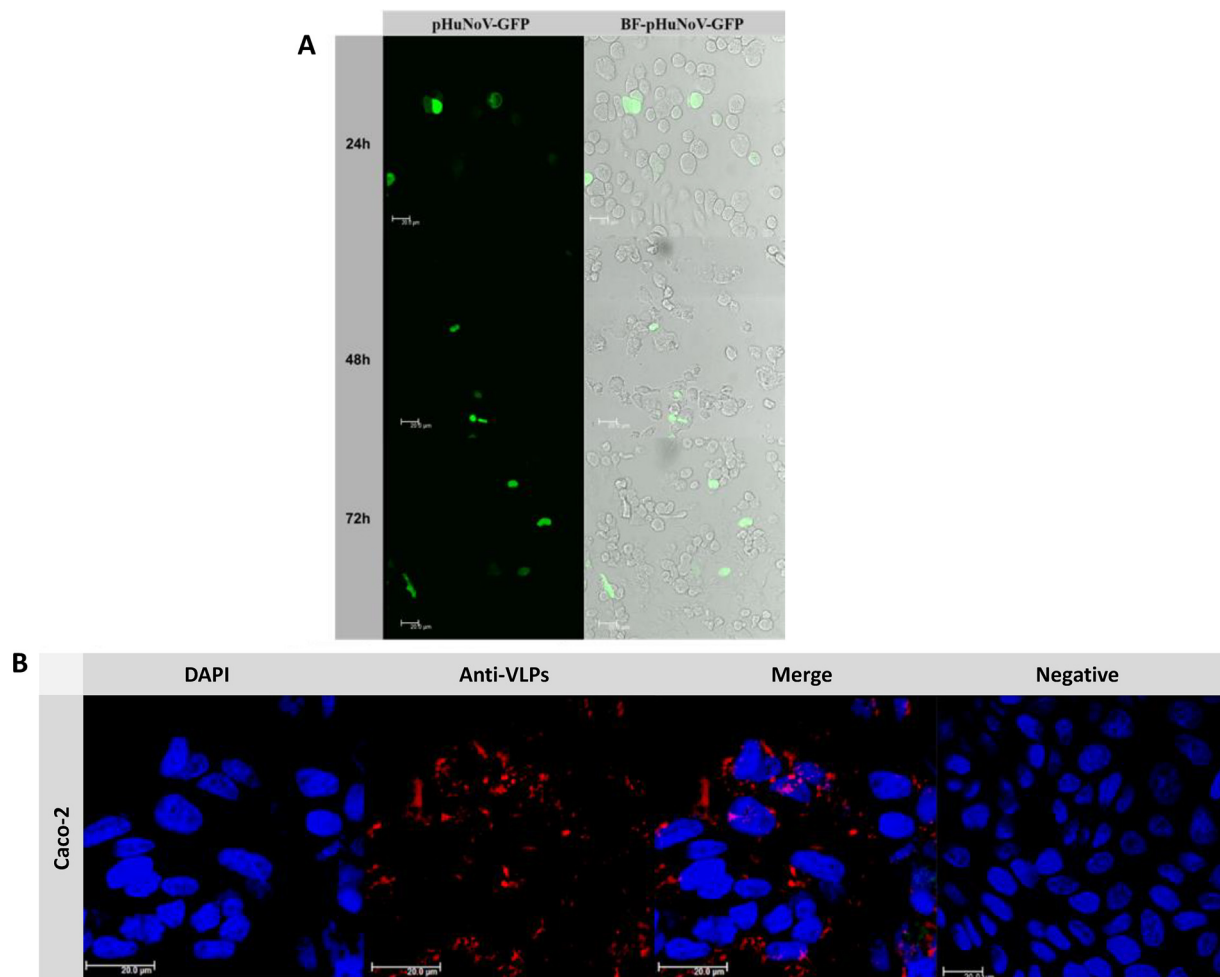


Fig. 3. Confocal microscopy micrographs of Caco-2 cells transfected with replicon pHuNoV-GFP. A) Confocal microscopy image of cells expressing GFP after transfection with replicon pHuNoV-GFP at 24, 48 and 72 h p.t. B) Immunostaining of VP1/VP2 proteins in Caco-2 cells transfected with pHuNoV-GFP. The red dots represent the VP1/VP2 protein stained with Alexa Fluor 633, using anti-VLPs as the primary antibody (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

indicative of the production of the negative strand of the viral genome and of the subgenomic RNA, and thus VP1/VP2, indicating that both the infectious clone (pHuNoV-Inf) and the replicon with the GFP reporter gene (pHuNoV-GFP) can be useful tools for studying the initial stage of noroviral replication.

The noroviral genotype of the constructs used in this study was the HuNoV GII.4-2012 Sydney subtype (Van Beek et al., 2013). This genotype remains an important variant of GII.4 in norovirus virology. In conclusion, we constructed the infectious clone using Gibson Assembly without inserting additional non-viral sequences and constructed its replicon containing the GFP reporter gene in polyprotein gene (ORF1) without eliminating any viral genes using the relevant HuNoV GII.4 Sydney subtype.

Conflicts of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgments

The authors would like to thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for their financial support. TN are CNPq fellows (306377/2014-4). We are grateful to Dr. Lucimeire Antonelli da Silveira for providing polyclonal

antiserum against NoV GII.4 VLPs (anti-VLPs) and to Mr. Ronaldo Portela for his contribution to the production of the figures.

Appendix A. Supplementary data


Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.05.011>.

References

- Aubry, F., Nougairède, A., Gould, E.A., Lamballerie, X., 2015. Flavivirus reverse genetic systems, construction techniques and applications: a historical perspective. *Antivir. Res.* 114, 67–85.
- Beckert, B., Masquida, B., 2011. Synthesis of RNA by in vitro transcription. *Methods Mol. Biol.* 703, 29–41.
- Chang, K.O., Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., King, A.D., Green, K.Y., 2006. Stable expression of a Norwalk virus RNA replicon in a human hepatoma cell line. *Virology* 353, 463–473.
- Huang, C., Yu, Y., 2013. Synthesis and labeling of RNA in vitro. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 4. <http://dx.doi.org/10.1002/0471142727.mb0415s102>.
- Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G., Dolin, R., Thornhill, T.S., Kalica, A.R., Chanock, R.M., 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.* 10, 1075–1081.
- Karst, S.M., 2016. The influence of commensal bacteria on infection with enteric viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 197–204.
- Katayama, K., Murakami, K., Sharp, T.M., Guix, S., Oka, T., Todaka, R.T., Nakanishi, A., Crawford, S.E., Atmar, R.L., Estes, M.K., 2014. Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E4043–E4052.
- Kocher, J., Yuan, L., 2015. Norovirus vaccines and potential antinorovirus drugs: recent

- advances and future perspectives. *Future Virol.* 10, 899–913.
- Lamounier, T.A.C., Oliveira, L.M., Camargo, B.R., Rodrigues, K.B., Noronha, E.F., Ribeiro, B.M., Nagata, T., 2015. Production of Brazilian human norovirus VLPs and comparison of purification methods. *Braz. J. Microbiol.* 46, 1265–1268.
- Royall, E., Doyle, N., Abdul-Wahab, A.A., Emmott, E., Morley, S.J., Goodfellow, I., Roberts, L.O., Locker, N., 2015. Murine Norovirus 1 (MNV1) replication induces translational control of the host by regulating eIF4E activity during infection. *J. Bio. Chem.* 290, 4748–4758.
- Siridechadilok, B., Gomutsukhavadee, M., Sawaengpol, T., Sangiambut, S., Puttikhunt, C., Chin-inmanu, K., Suriyaphol, P., Malasit, P., Sreaton, G., Mongkolsapaya, J., 2013. A simplified positive-sense-RNA virus construction approach that enhances analysis throughput. *J. Virol.* 87, 12667–12674.
- Tuo, D., Shen, W., Yan, P., Li, X., Zhou, P., 2015. Rapid construction of stable infectious full-length cDNA clone of papaya leaf distortion mosaic virus using in-fusion cloning. *Viruses* 7, 6241–6250.
- Van Beek, J., Ambert-Balay, K., Botteldoorn, N., Eden, J., Fonager, J., Hewitt, J., Iritani, N., Kroneman, A., Vennema, H., Vinjé, J., White, P.A., Koopmans, M., 2013. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Euro Surveill.* 18, 8–9.
- Xia, W., Bringmann, P., McClary, J., Jones, P.P., Manzana, W., Zhu, Y., Wang, S., Liu, Y., Harvey, S., Madlansacay, M.R., McLean, K., Rosser, M.P., MacRobbie, J., Olsen, C.L., Cobb, R.R., 2006. High levels of protein expression using different mammalian CMV promoters in several cell lines. *Protein Expr. Purif.* 45, 115–124.
- Yamshchikov, V., Mishin, V., Cominelli, F., 2001. A new strategy in design of + RNA virus infectious clones enabling their stable propagation in *E. Coli*. *Virology* 281, 272–280.

A novel vitivirus-like sequence found in *Arracacia xanthorrhiza* plants by high throughput sequencing

Layssa M. Oliveira¹ · Anelise F. Orfílio¹ · Alice K. Inoue-Nagata² · Tatsuya Nagata¹ · Rosana Blawid¹ 

Received: 13 November 2016 / Accepted: 6 February 2017
© Springer-Verlag Wien 2017

Abstract High throughput sequencing (HTS) is a very powerful tool for detecting and discovering novel viral-like sequences without prior knowledge of the sequence. Here we describe the complete genome of a new vitivirus-like sequence that was found in arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) plants using HTS technology. The complete genome sequence was validated by Sanger sequencing. The genomic organization of the new putative vitivirus resembles that of grapevine virus B (GVB) and grapevine virus D (GVD). The putative coat protein showed 41 to 49% identity with similar proteins of known vitiviruses, while the RNA-dependent RNA polymerase shared 52 to 55% identity with those encoded by grapevine vitiviruses. Based on the demarcation criteria for the genus *Vitivirus*, the virus described in this work, provisionally named as “*Arracacha virus V*”, represents a novel species in this taxon.

Arracacia xanthorrhiza is a plant native to the Andean region used as root vegetables in the human diet; it is rich in minerals, vitamins and carbohydrates. In Brazil, arracacha crop is planted mainly by small farmers. Nevertheless, there is an increasing interest in its cultivation due to its agronomical traits. Arracacha plants have a good

tolerance to diseases, despite their long growth period, which ranges from eight to eleven months and is therefore longer than most other vegetables. The crop is mainly vegetatively propagated and therefore the accumulation of different pathogens such as viruses can occur [1].

Seven viruses have been reported to infect arracacha plants in the Andean region. In Brazil, only two potyviruses infecting arracacha plants have been described: these are arracacha mottle virus (AMoV) [2] and a recently reported bidens mosaic virus [3]. Taxonomically, the *Vitivirus* genus belongs to the *Betaflexiviridae* family. Vitiviruses have a positive-strand RNA virus genome of about 7.3–7.6 kb, excluding the poly(A) tail [4]. The genomic RNA contains five overlapping open reading frames (ORFs) and possesses a cap structure at its 5′ terminus, as well as a poly(A) tail at its 3′-end [5]. ORF1 encodes a large polyprotein comprising protein domains of a methyltransferase, an iron(II)- and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase (AlkB), a helicase, and an RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) [6, 7]. Little is known about the function of ORF2-coded protein but it has been linked to virus transmission in grape plants by mealybugs [5]. The proteins encoded by ORF3 and ORF4 are the movement protein (MP) and the coat protein (CP), respectively. The last ORF encodes a putative polypeptide which is similar to nucleic acid-binding proteins (NB) [5].

HTS technology has been shown to be a powerful tool for detecting and identifying novel viruses without *a priori* genome sequence knowledge. Here we describe a putative new member of the genus *Vitivirus* that was found in arracacha plants by HTS. Arracacha plants showing mild mosaic chlorosis and slight leaf deformation symptoms were collected in 2015 from two regions in Brazil, São Paulo and the Federal District. Leaf samples of approximately 50 plants were used for semi-purification of viral

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00705-017-3326-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Rosana Blawid
rblawid@gmail.com

¹ Department Cell Biology, University of Brasília, 70910-900 Brasília, DF, Brazil

² Embrapa Vegetables, Caixa Postal 218, 70275-970 Brasília, DF, Brazil

particles, followed by total RNA extraction. Briefly, 60 g of plant tissue were grounded in liquid nitrogen, homogenized in phosphate buffer (pH 8.0) and filtered with a cheesecloth. The filtrate was centrifuged for 20 min at 3836 x g, followed by an ultracentrifugation at 33,000 x g for 2 hours on a 20% sucrose cushion. Total RNA extraction was performed from the semi-purified plant material with the AllPrep DNA/RNA mini kit (Qiagen, Hilde, Germany). The sample of pooled RNAs was sent directly to Macrogen Inc. (Seoul, South Korea) for sequencing with the Illumina HiSeq 2000 platform. Reads were trimmed using Trimmomatic v.0.36 and *de novo* assembled with Velvet v.1.2.10 [8] and SPAdes v.3.9 [9]. The contigs were used for tBlastX analysis against the current RefSeq Virus database available in GenBank. After contig extension and re-mapping with the Geneious R8.0 software, a final contig of 7341 bp, excluding the poly(A) tail and with a mean coverage level of 1702 bp, was obtained. Overall, 41,576 reads were assembled and this novel viral-like sequence showed the highest amino acid identity to vitivirus sequences and also displayed a genomic organization similar to that of vitiviruses.

Samples from a total of 48 symptomatic or asymptomatic plants were tested for vitivirus infection by RT-PCR using the following primers, targeting the CP region: CP forward (5'-ACC GCA GTG ATA ACG CTC CTC-3') and CP reverse (5'-ACA GCC TGT TCG CCA ACA GAA G-3'). Among the 48 plants, 13 were found to be positive for vitivirus infection. To validate the HTS results, one plant was randomly chosen (M#12) and the complete vitiviral genome sequence was determined by Sanger sequencing. For this, we designed primers to amplify three overlapping fragments covering the entire genome sequence (Table S1, Supplementary Material). Total RNA was extracted from the arracacha plant using TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, California, USA) and cDNA synthesis was performed using the SuperScript[™] IV Reverse Transcriptase kit (Thermo Fisher Scientific Inc., New York).

Second-strand cDNA synthesis and amplifications were performed according to standard protocols using the Phusion *Taq* DNA polymerase (NEB, Ipswich, USA). The 5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Version 2.0, Thermo Fisher Scientific Inc., New York) was used, according to the manufacturer's instruction, to determine and confirm the first 673 nucleotides (nt) of the viral genome. To determine the 3'-terminal end, 3'-RACE was used according to Filho et al. [10]. Amplified fragments were gel-purified with the GE Healthcare Life Sciences kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) and the complete genomic

sequence was determined by Sanger sequencing of the PCR product (Macrogen Inc., Seoul, South Korea).

The complete amino acid sequences coded by ORF1 (replicase), ORF3 (movement protein), ORF4 (coat protein) and ORF5 (nucleic acid-binding proteins) were compared with the genome sequences of viruses belonging to the family *Betaflexiviridae*. Amino acid sequence identities were analyzed using the Sequence Demarcation Tool (SDT) program [11] and phylogenetic analyses were performed based on amino acid sequences (MEGA6.0 software) [12]. The neighbor joining (NJ) method was used to construct the phylogenetic trees with JTT and Freq. (F⁺) model and the test of phylogeny was evaluated with 1500 bootstrap replications.

The complete genomic sequence of this novel arracacha virus comprises 7398 nt (GenBank accession number KY392781), excluding the poly(A) tail at its 3' end. Four putative ORFs (ORF1, ORF3, ORF4 and ORF5) were predicted from the viral genome. ORF1 (5118 nt) encodes a putative polypeptide of 1705 amino acids (aa) with a calculated molecular weight (MW) of 25.54 kDa. Four putative domains have been described for the polyprotein: a methyltransferase domain at its N-terminal region (aa 46 to 339), AlkB (aa 606-759), a viral helicase motif located at aa position 939 to 1055 and an RdRp core motif located near its C-terminal region (Fig 1a). Moreover, the ORF1 amino acid sequence shares 40 to 43% of identity with sequences of other viruses belonging to the genus *Vitivirus* (Table 1). ORF3 (882 nt) is predicted to consist of 293 aa and encodes a putative protein of predicted MW of 32.83 kDa that shows 20-32% identity to the MP of other vitiviruses (Table 1). The ORF4 (579 nt), which overlaps with ORF3 by 56 nt, encodes the putative CP consisting of 192 aa (predicted MW of 20.9 kDa). The CP is the most conserved protein within the genus *Vitivirus*, which shares identities varying from 41 to 49% with other vitiviruses (Table 1). The ORF5 (333 nt) encodes a putative protein of 110 aa which is 24 to 38% identical to homologous vitiviral proteins. Moreover, SMART analysis predicted a putative NB domain [13] (Fig 1a). Although this new vitivirus shares many characteristics with other vitiviruses, the ORF2, which has been linked to transmission by mealybugs in grapevines [5], was not found. The absence of the ORF2 gene (frame 2) of arracacha virus V (AVV) is most likely related to the presence of eight intermittent stop codons close to its 5' end region. Furthermore, we could not find the conserved hexanucleotide promoter-like sequence (UUA A(G)/GU) usually located upstream the MP and CP ORFs in alpha- and beta-flexiviruses. After multiple sequence alignment analysis, we could identify the

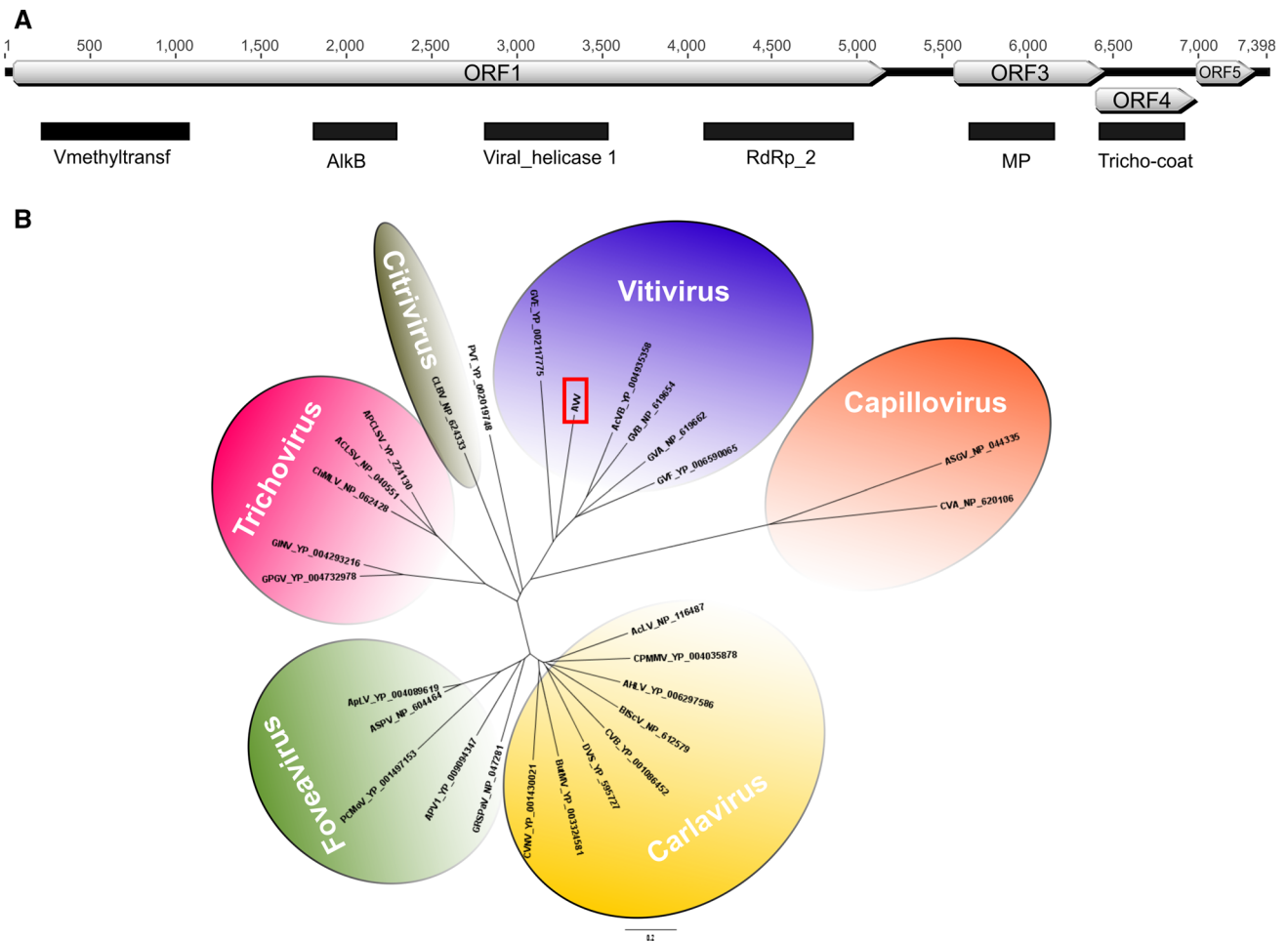


Fig. 1 **a** Schematic representation of the genomic organization of arracacha virus V (red box). Numbers indicate the nucleotide position (nt) at the genomic sequence, excluding the poly(A) tail. Abbreviations: Viral methyltransferase (Vmethyltransf); iron(II)- and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases (AlkB); RNA-dependent RNA polymerases (RdRp); Movement Protein (MP). Coat Protein (Tricho-coat). **b** Phylogenetic tree based on the entire sequence of the replication proteins of members of the family *Betaflexiviridae* constructed with MEGA 6. The neighbor joining (NJ) method with the model JTT with Freq. (F^+) was used to construct the phylogenetic tree. Branch lengths are drawn to scale. The generated tree is unrooted and the phylogenetic distances are in the unit of expected number of substitutions per site. Sequence accession numbers are reported and virus acronyms are as follows: grapevine virus E (GVE), actinidia

virus B (AcVB); grapevine virus B (GVB), grapevine virus A (GVA), grapevine virus F (GVF), potato virus T (PVT), Citrus leaf blotch virus (CLBV), apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus (APCLSV), apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), cherry mottle leaf virus (ChMLV), grapevine berry inner necrosis virus (GINV), grapevine pinot gris virus (GPGV), apricot latent virus (APLV), apple stem pitting virus (ASPV), peach chlorotic mottle virus (PCMoV), asian prunus virus 1 (APV1), grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV), coleus vein necrosis virus (CVNV), butterbur mosaic virus (ButMV), Daphne virus S (DVS), chrysanthemum virus B (CVB), blueberry scorch virus (BIScV), american hop latent virus (AHLV), cowpea mild mottle virus (CPMMV), aconitum latent virus (AcLV), apple stem grooving virus (ASGV), and cherry virus A (CVA) (Color figure online)

following putative promoter-like sequences of ORF2: (UUA AGU) for grapevine virus A (GVA); (UUA AGC) for grapevine virus E (GVE); and (UUA GGU) for grapevine virus F (GVF) or GVB. These promoter-like sequences were not found in the AVV genome.

Based on amino acid sequence analysis, the vitiviral RdRp and CP proteins show a close relationship with members of the genus *Vitivirus*, including the species

Grapevine virus F, *Grapevine virus A*, *Grapevine virus B*, *Actinidia virus A*, and *Actinidia virus B*. Phylogenetic analysis of the ORF1-coded polyprotein shows that the AVV clusters with known vitiviruses (Fig. 1b). AVV CP protein is most closely related to the CP of GVE and most distantly related to the CP of actinidia virus A (AcVA) and actinidia virus B (AcVB) (virus that infects kiwi plants) (data not shown).

Table 1 Percent amino acid sequence identities between four coding open reading frames from the arracacha virus V and proteins coded by other vitiviruses

Virus	GenBank accession number	ORF1 (Rep*)	ORF3 (MP*)	ORF4 (CP*)	ORF5/6 (NB*)
VITIVIRUS					
Grapevine virus A (GVA)	DQ855086	42	30	42	32
Grapevine virus B (GVB)	EF583906	43	29	46	33
Grapevine virus D (GVD)	CAA69070	-	-	49	-
Grapevine virus E (GVE)	KF588015	40	30	45	38
Grapevine virus F (GVF)	NC018458	40	32	41	34
Actinidia virus A (AcVA)	JN427014	41	28	46	24
Actinidia virus B (AcVB)	NC016404	40	20	46	29

* aa%; Rep (Replicase); MP (Movement Protein); CP (Coat Protein); NB (Nucleic-acid-Binding protein)

According to the species demarcation criteria within the genus *Vitivirus*, viruses from distinct species should have less than 80% identity at the amino acid level or less than 72% of nucleotide identity in the CP or RdRp sequences. After SDT analysis, the highest amino acid identity was observed with the RdRp protein of GVA (55%) and the CP of GVD (49%). Giving these findings, the newly discovered virus from arracacha should be considered as member of a new species belonging to the genus *Vitivirus*, which we tentatively named as “*Arracacha virus V*”.

Acknowledgements This work was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and EMBRAPA- Hortaliças. We thank Dr. Nuno Rodrigo Madeira for providing the infected arracacha samples. AKIN and TN are CNPq fellows. A.F.O. was recipient of a fellowship from CNPq-CsF Program.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Luengo RFA, Parmagnani RM, Parente MR, Lima MFBF (2000) Tabela de composição nutricional de hortaliças. Embrapa Hortaliças. <https://www.embrapa.br/documents/1355126/9124396/Tabela+Nutricional+de+Hortali%C3%A7as/d4ae0965-9e94-4f19-a20e-b7721bdc1266>. Accessed 11 Nov 2016
- Orlíio AF, Lucinda N, Dusi NA, Nagata T, Inoue-Nagata AK (2013) Complete genome sequence of arracacha mottle virus. *Arch Virol* 158:291–295
- Orlíio AF, Dusi NA, Madeira NR, Inoue-Nagata AK (2016) First report of Bidens mosaic virus in Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) from Brazil. *Plant Dis.* doi:10.1094/PDIS-05-16-0616-PDN (Accessed 11 November 2016)
- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (2012) Virus taxonomy—ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, London
- Jacques DP, Dirk S, Munir M, Johan TB (2011) The grapevine-infecting vitiviruses, with particular reference to grapevine virus A. *Arch Virol* 156:1495–1503
- Born E, Omelchenko MV, Bekkelund A, Leihne V, Koonin EV, Dolja VV, Falnes Falnes P (2008) Viral AlkB proteins repair RNA damage by oxidative demethylation. *Nucleic Acids Res* 36:5451–5461
- Martelli GP, Adams MJ, Kreuze JF, Dolja VV (2007) Family Flexiviridae: a case study in virion and genome plasticity. *Annu Rev Phytopathol* 45:73–100
- Zerbino DR, McEwen GK, Margulies EH, Birney E (2009) Pebble and rock band: Heuristic resolution of repeats and scaffolding in the Velvet short-read de novo assembler. *PLoS One* 4:e8407
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its application to single-cell sequencing. *J Comp Biol* 19:455–477
- Filho Fde A, Nicolini C, Resende RO, Andrade GP, Pio-Ribeiro G, Nagata T (2013) The complete genome sequence of a Brazilian isolate of yam mild mosaic virus. *Arch Virol* 158:515–518
- Muhire BM, Varsani A, Martin DP (2014) SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS One* 9:e108277
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) Mega6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729
- Letunic I, Doerks T, Bork P (2014) SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res* 43:257–260

Short Communication

Production of Brazilian human norovirus VLPs and comparison of purification methods

Thais Alves da Costa Lamounier¹, Layssa Miranda de Oliveira²,
Brenda Rabello de Camargo², Kelly Barreto Rodrigues², Eliane Ferreira Noronha²,
Bergmann Morais Ribeiro², Tatsuya Nagata²

¹Departamento de Farmácia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

²Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Submitted: November 5, 2014; Approved: April 12, 2015.

Abstract

Noroviruses (NVs) are responsible for most cases of human nonbacterial gastroenteritis worldwide. Some parameters for the purification of NV virus-like particles (VLPs) such as ease of production and yield were studied for future development of vaccines and diagnostic tools. In this study, VLPs were produced by the expression of the VP1 and VP2 gene cassette of the Brazilian NV isolate, and two purification methods were compared: cesium chloride (CsCl) gradient centrifugation and ion-exchange chromatography (IEC). IEC produced more and purer VLPs of NV compared to CsCl gradient centrifugation.

Key words: Norwalk virus, VLP, ion-exchange chromatography.

Human noroviruses (HuNVs) are responsible for major outbreaks of nonbacterial gastroenteritis for all ages worldwide. HuNVs cause acute gastroenteritis in schools, kindergartens, homes for the aged, cruise ships and even hospitals. A million cases noroviral infection are verified by laboratory diagnosis each year globally, and 110,000 and 19 million infections were observed last year in Germany and the United States (CDC, 2014), respectively. A large norovirus gastroenteritis outbreak occurred in the Brazilian state of São Paulo in the summer of 2010 (Morillo *et al.*, 2011).

The HuNVs are classified into genogroups I (GI), II (GII) and IV (GIV) of Norwalk virus species. GI currently has nine genotypes, GII has 22 and GIV has two (La Rosa *et al.*, 2008; Kroneman *et al.*, 2013). Among these genotypes, GII.4 is responsible for most outbreaks detected in more than 60-80% of cases of acute gastroenteritis caused by NVs (Lindesmith *et al.*, 2008). In Brazil, the surveillance of acute diarrhea by the Ministry of Health still does not include this agent, so the impact of HuNV on public health in Brazil is being studied for research groups in states such as Rio Grande do Sul and Pará (Fioretti *et al.*, 2011; de Andrade *et al.*, 2014; Siqueira *et al.*, 2013).

Virus-like particles (VLPs) prepared by expressing capsid genes using a baculoviral expression system is a useful tool for studying uncultivable viruses such as HuNVs. HuNV VLPs and the native particles have very similar physicochemical and antigenic characteristics (Herbst-Kralovetz *et al.*, 2010; Fang *et al.*, 2013). The VLPs have thus been used for immunological studies producing polyclonal and monoclonal antibodies against HuNV VLPs and also for the search for the cellular receptors of NVs (Herbst-Kralovetz *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2011). Immunological diagnostic tools such as ELISAs are very useful in public health, but Brazil does not yet have a good and abundant source of antibodies for NV diagnostics.

The self-assembling norovirus virus-like particles with capsid protein expression has spurred the development of vaccines, because the particles are assembled similarly to the native viruses and do not cause infection. The intranasal and oral administration of VLPs has been used for inducing mucosal immunity against NV infection. Furthermore, these particles are being used as tools to elucidate the role of immune cells such as T and B lymphocytes in infections caused by this virus. Studies of NV VLP vaccines have focused on a single genogroup, but multivalent vac-

cines using different genogroups are more interesting for a broader protection (Sundararajan *et al.*, 2015).

The objective of this study was to establish VLPs of NV GII.4 by the expression of the VP1 and VP2 gene cassette for future use as antigens for the development of diagnostic tools. The ease and efficiency of VLP purification were also assessed by comparing ultracentrifugation using cesium chloride and ion-exchange chromatography.

One fecal suspension positive for HuNV was obtained from a seven-year-old child at the laboratory of Virology, Central Public Health Laboratory of the Federal District (LACEN-DF), during a research project approved by the Ethics Committee in Research for protocol N° SES/DF #93/09 on 11/05/2009. Total RNA was extracted from this sample using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instruction. Complementary DNA (cDNA) was obtained by reverse transcription using Superscript III (Invitrogen) with an oligo-dT primer (Oligo dT50M10: AAG CAG TGT TAT CAA CGC AGA T₅₀). The cDNA fragments of approximately 2.4 kb containing the complete VP1 and VP2 capsid genes and the 3'UTR (untranslated region) were amplified by PCR using NoroII-BamHI forward primer (TTT GGA TCC ATG AAG ATG GCG TCG AAT GAC) and PstI-SacI M10 reverse primer (TAT TCT GCA GAG CTC AAG CAG TGT TAT CAA CGC AGA). The PCR was performed using LongAmp *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs, NEB, Ipswich, MA, USA). The PCR mixture was prepared as follows: 5 µL of 5X LongAmp *Taq* Reaction Buffer (NEB), 3 µL of 2.5 mM dNTPs, 0.5 µL each of forward and reverse primers (10 mM), 1 µL of cDNA, 1 µL of LongAmp *Taq* DNA polymerase (2 U) and Milli-Q water (Whatman-GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) to 25 µL. The cycle was set as follows: pre-cycle denaturation step of 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 56 °C for 30 s and extension at 65 °C for 3 min and a final extension at 65 °C for 10 min.

The amplified cDNA containing the VP1 and VP2 genes and the 3'UTR was cloned in the pGEM-T Easy plasmid (Promega, Madison, WI, USA) and subcloned in the baculoviral system plasmid pFASTBac1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The cloning of this bicistronic gene cassette by ribosomal termination-reinitiation was confirmed by sequencing by Macrogen Inc. (Seoul, Korea). The expression of VP1 is sufficient for VLP assembly, but the expression of the VP1-VP2-3'UTR gene cassette is a better strategy for stable and efficient VLP formation (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2003; Vongpunsawad *et al.*, 2013). After constructing the bacmid using the baculoviral Bac-to-Bac system (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, we produced the VP1 and VP2 proteins in the insect cell lines BTI-4-Tn5B1, Sf9 and Sf21.

Preliminary testing indicated that VP1 expression level was higher in the BTI-Tn5B1-4 than the Sf9 and Sf21

cells. VP1 is secreted into the culture medium in the baculoviral expression system, so VLP purification began with the culture medium of the infected cells. The culture medium (105 mL) was centrifuged at 5,000 x *g* at 4 °C for 10 min to remove the cells, and the supernatant was ultracentrifuged with 20% sucrose cushion at 115,878 x *g* for 1 h at 4 °C. The pellet was resuspended in 0.5X PBS buffer (pH 5.5), and the solution was added to the top of a cesium chloride solution (CsCl 0.39 g/mL) diluted in 0.5X PBS pH 5.5, following the method by Ausar *et al.*, 2006. The sample was ultracentrifuged at 114,600 x *g* for 18 h at 4 °C. The upper, middle and lower fractions were collected and dialyzed three times in 0.5X PBS pH 5.5 with 3 h intervals. The samples were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using a polyclonal antibody against NV (GII.4).

VLP assembly in the purified preparation was confirmed by transmission electron microscopy. A formvar-coated nickel grid (200 mesh) was incubated over 40 µL of the purified VLP solution in PBS for 5 min, and the sample grids were contrasted with 1% uranyl acetate for 5 min, then air dried. The VLPs were observed with a JEM 1011 electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan).

The VLPs were also purified by ion-exchange chromatography for comparison. After the 20% sucrose-cushion ultracentrifugation, the pellet was resuspended with sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0). The VLPs were purified under appropriate conditions by an ÄKTA purifier (GE Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) using a HiTrap Q FF column (GE Life Sciences) at a flow rate of 150 cm/h (Koho *et al.*, 2012). The bound protein was eluted with stepwise increments in ionic strength to 1 M NaCl, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0. The NV VP1 fractions were collected with increasing salt concentrations of 10, 20 and 40%. After purification by both methods (CsCl isopycnic centrifugation and Ion-exchange chromatography), the proteins were quantified by the NanoDrop 3300 Quant-iT Protein Assay (Invitrogen).

No bands were observed from CsCl ultracentrifugation, perhaps due to the low concentration of VLPs. The top, middle and bottom fractions were again ultracentrifuged to precipitate possible VLPs in each fraction. All three fractions were subjected to SDS-PAGE and subsequent Western blotting. The SDS-PAGE produced protein bands of approximately 60 kDa, close to the expected size of 59 kDa (Figure 1A). These proteins, however, were not the target proteins. The Western blotting identified specific signals only for the middle and bottom fractions of the CsCl ultracentrifugation (Figure 1B, lanes 4 and 5) but not for the negative control and the top fraction (Figure 1B). Two specific signals of approximately 59 kDa and 56 kDa were identified, which are the common sizes of VP1 produced by the baculoviral expression system (Figure 1B arrow). The smaller protein was the cleaved VP1 lacking the N terminus (Ausar *et al.*, 2006). We thus concluded that VP1 is an insoluble protein, which can be separated by ultracentrifuga-

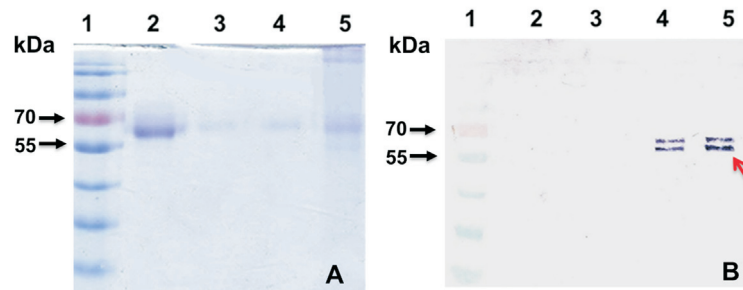


Figure 1 - Analysis of fractions for VP1 proteins by SDS-PAGE and Western blotting prepared by CsCl isopycnic centrifugation. (A) SDS-PAGE gel stained with Coomassie Brilliant Blue and (B) Western blotting using a polyclonal antibody against NV GII.4. Lane 1, PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific); lane 2, uninfected insect cells (negative control); lane 3, top fraction collected from CsCl centrifugation; lane 4, middle fraction; lane 5, bottom fraction. The arrow in B indicates the specific reaction by Western blotting using the antibody against NV.

tion with a 20% sucrose cushion and with a buoyant density heavy enough to remain in the middle and bottom fractions of the CsCl gradient. The dispersed distribution of VLPs in both fractions, however, suggested the failure of gradient formation in the CsCl isopycnic centrifugation under the conditions used.

The possibility of the presence of VP1 in the cultured cells was also evaluated. The contents of the collected cells were also subjected to SDS-PAGE and Western blotting after boiling for 5 min with Laemmli buffer containing SDS, but almost no VP1 was detected from the infected cells (data not shown).

To determine if the purified VP1 assembled VLPs, we prepared grids with these two fractions. Round particles with protruding structures, which are typical of the VLPs of NV were observed by transmission electron microscopy (Figure 2A). All VLPs had negatively stained central areas. The diameter of the VLPs was estimated at approximately 40 nm, indicating $T = 3$ icosahedral particles. Natural virus particles and adequate VLPs are $T = 3$ icosahedral capsids containing 180 capsomeres of the VP1 protein, with a diameter of approximately 40 nm (Tresset *et al.*, 2013), but artificial VLPs produced by VP1 expression also often make $T = 1$ icosahedral particles of 23 nm. In our study, no $T = 1$ particles were observed, indicating that the amino

acid sequence of the VP1 in this study showed the stable characteristics of VP1 proteins for VLP assembly.

To determine relative VLP yields, we compared ion-exchange chromatography to CsCl centrifugation. The collected fractions were subjected to SDS-PAGE and Western blotting (Figure 3). For visualizing the small amounts of contaminant proteins, the SDS-PAGE gel was silver stained, which is more sensitive than staining with Coomassie Brilliant Blue (Figure 3A). Double protein bands above the 50 kDa indicator protein were observed in the SDS-PAGE (Figure 3A). The identities of these protein bands as VP1 were confirmed by Western blotting (Figure 3B).

The relative strengths of the signals in Figures 1B and 3B indicated that the yield of VP1 was higher by this method than by CsCl ultracentrifugation. The formation of VLPs was also confirmed by electron microscopy (Figure 2B). Abundant VLPs were observed in this preparation and the amount of VLPs obtained by ion-exchange chromatography was greater than that obtained by CsCl centrifugation. The average yield of purified VLPs was 1.50 mg/L by CsCl centrifugation and 9.31 mg/L by ion-exchange chromatography so the yield was 6.2-fold higher for ion-exchange chromatography than for CsCl centrifugation. We also concluded that ion-exchange chromatography produced purer VLPs than the CsCl gradient under our conditions. NV VLP purification by ion-exchange chromatography is recommended over CsCl centrifugation and laboratory-scale VLP purification by CsCl ultracentrifugation often produces sufficient purity and yield, but the procedure requires long ultracentrifugation times. Furthermore, this purification procedure may affect the morphological integrity, functionality and antigenicity of the purified VLPs (Huhti *et al.*, 2010). Ion-exchange chromatography avoids these negative effects thus we concluded that ion-exchange chromatography was the better of the two methods in terms of quality and quantity of VLPs. In addition, purification by ion-exchange chromatography can be advantageous for large-scale VLP production for vaccine development.

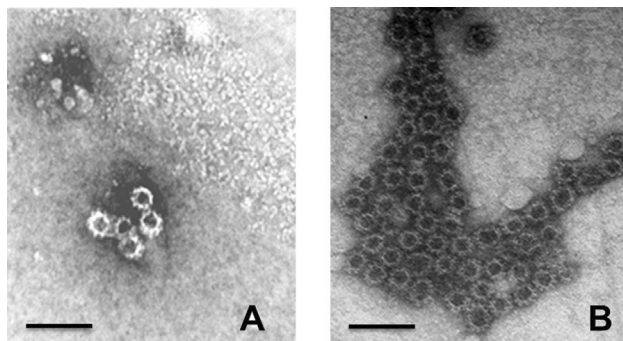


Figure 2 - Electron micrographs showing the virus-like particles (VLPs) of NV with diameters of approximately 40 nm by negative staining. VLPs prepared by A) CsCl isopycnic centrifugation and B) ion-exchange chromatography. Scale bar = 100 nm.

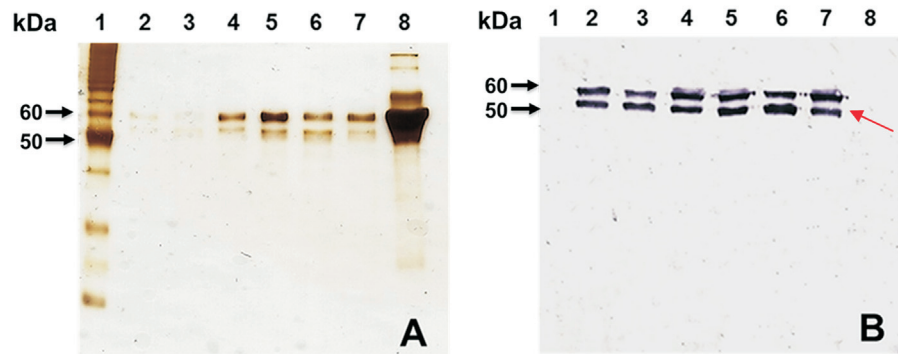


Figure 3 - Analysis of fractions of VP1 proteins by SDS-PAGE and Western blotting prepared by ion-exchange chromatography. (A) Silver-stained SDS-PAGE gel and (B) Western blotting using a polyclonal antibody against NV GII.4. Lane 1, unstained Novex Sharp Protein Standard ladder (Invitrogen); lanes 2, 3 and 4, fraction 14 of the chromatogram after IEC; lanes 5, 6 and 7, fraction 15 after IEC; lane 8, uninfected insect cell lysate (negative control). Note: the proteins in the uninfected cell lysate identified by silver staining was not reactive in the Western blotting. The arrow in B indicates the specific reaction by Western blotting using the antibody against NV.

This study describes a convenient procedure for the preparation and purification of NV VLP as a first step toward NV surveillance in Brazil. Further development of tools for studying NV is required to improve the epidemiological study of NV in Brazil.

Acknowledgments

We thank the Microscopic Laboratory University of Brasilia and also especially thank Dr. Shinichi Kobayashi (Aichi Prefectural Institute of Public Health, Nagoya, Japan) for kindly providing the polyclonal antibody against NV GII.4 VLPs. “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq, Brazil) for their financial support of EFN, BMR and TN.

References

- Ausar SF, Foubert TR, Hudson MH *et al.* (2006) Conformational Stability and Disassembly of Norwalk Virus-like Particles. *J Biol Chem* 281:19478-19488.
- Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM *et al.* (2003). The 3' end of norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol* 77:11603-11615.
- Centers for Disease Control and Prevention (2014) Burden of norovirus illness and outbreaks. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta.
- de Andrade Jda S, Rocha MS, Carvalho-Costa FA *et al.* (2014) Noroviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, 2004-2011. *J Clin Virol* 61:345-352.
- Fang H, Tan M, Xia M *et al.* (2013) Norovirus P Particle Efficiently Elicits Innate, Humoral and Cellular Immunity. *PlosOne* 8:e63269.
- Fioretti JM, Ferreira MSR, Victoria M *et al.* (2011) Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106:942-947.
- Herbst-Kralovetz M, Mason HS, Chen Q (2010) Norwalk virus-like particles as vaccines. *Expert Rev Vaccines* 9:299-307.
- Huhti L, Blazevec V, Nurminen K *et al.* (2010) A comparison of methods for purification and concentration of norovirus GII-4 capsid virus-like particles. *Arch Virol* 155:1855-1858.
- Koho T, Mäntylä T, Laurinmäki P *et al.* (2012) Purification of norovirus-like particles (VLPs) by ion exchange chromatography. *J Virol Methods* 181:6-11.
- Kroneman A, Vega E, Vennema H *et al.* (2013) Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol* 158:2059-2068.
- La Rosa, Pourshaban M, Iaconelli M *et al.* (2008) Detection of genogroup IV noroviruses in environmental and clinical samples and partial sequencing through rapid amplification of cDNA ends. *Arch Virol* 153:2077-2083
- Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD *et al.* (2008). Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med* 5:e31.
- Morillo SG, Luchs A, Cilli A *et al.* (2011). Large gastroenteritis outbreak due to Norovirus GII in São Paulo, Brazil, summer 2010. *Rev Inst Med Trop* 53:119-120.
- Siqueira JA, Linhares Ada C, de Carvalho TC *et al.* (2013) Norovirus infection in children admitted to hospital for acute gastroenteritis in Belém, Pará, Northern Brazil. *J Med Virol* 85:737-744.
- Sundararajan A, Sangster MY, Frey S *et al.* (2015) Robust mucosal-homing antibody-secreting B cell responses induced by intramuscular administration of adjuvanted bivalent human norovirus-like particle vaccine. *Vaccine* 33:568-576.
- Tan M, Huang P, Xia M *et al.* (2011) Norovirus P particle, a novel platform for vaccine development and antibody production. *J Virol* 85:753-764.
- Tresset G, Decouche V, Bryche JF *et al.* (2013) Unusual self-assembly properties of Norovirus Newbury2 virus-like particles. *Arch Biochem Biophys* 537:144-152.
- Vongpunsawad S, Venkataram Prasad BV, Estes MK (2013) Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain. *J Virol* 87:4818-4825.

Associate Editor: Mauricio Lacerda Nogueira