

Universidade do Minho
Escola de Ciências

Edite Dias Lopes

**Utilização da levedura como sistema de
produção de uma proteína da cápside de
um novo norovirus canino**

Tese de Mestrado
Genética Molecular

Trabalho efetuado sob a orientação de:
Professora Doutora Lucília Saraiva
Doutora Clara Pereira
Professora Doutora São José Nascimento

E co-orientação de:
Professora Doutora Dorit Schuller

Outubro de 2011

DECLARAÇÃO

Nome

Edite Dias Lopes

Endereço electrónico: ditedias@gmail.com

Telefone: 932421558

Número do cartão de cidadão: 12992074

Título da tese

Utilização da levedura como sistema de produção de uma proteína da cápside de um novo norovirus canino

Orientadores

Prof.^a Doutora Lucília Saraiva; Doutora Clara Pereira e Prof.^a Doutora Maria São José Nascimento

Co - Orientadora

Prof.^a Doutora Dorit Schuller

Ano de conclusão: 2011

Tese de mestrado em: Genética Molecular

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE

Universidade do Minho, 28/10/2011

Assinatura:

Agradecimentos

O trabalho que apresento na dissertação do meu mestrado, foi realizado ao longo do último ano no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

À Prof.^a Doutora Lucília Saraiva, que além de ter aceitado ser orientadora deste trabalho, sempre me disponibilizou, desde o primeiro instante, o seu tempo, foi incansável nas suas recomendações, contribuindo para um maior crescimento científico e pessoal.

À Doutora Clara Pereira, pelo acolhimento no laboratório como minha orientadora, me proporcionou a aprendizagem de novas técnicas, que me transmitiu, de forma simples e acessível, conceitos e técnicas de biologia molecular, pelo apoio incansável, pela disponibilidade, pelas recomendações e pela revisão cuidada desta tese.

À Prof.^a Doutora Maria de São José Nascimento, pelo entusiasmo inculcido e aceitação das funções de orientadora deste trabalho.

À Prof.^a Doutora Dorit Schuller, pela aceitação das funções de co-orientadora deste trabalho.

Ao Dr. João Mesquita, pela disponibilidade, permitindo o enriquecimento deste trabalho com o uso de técnicas por ele trabalhadas.

A todas as colegas que desenvolveram as suas atividades no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia, à Mariana pela sua calma e ajuda, à Isabel pelos conselhos, à Cláudia pela ajuda, conselhos e conversas.

Aos técnicos Cristina, Nuno e Céu, pelo carinho e ajuda infinita na disponibilização do material.

À Daniela pela amizade e conversas inacabáveis, a todos os meus amigos por partilharem todos os momentos da minha vida.

À minha família, ao meu pai, aos meus irmãos, por estarem sempre presentes em todas as decisões que tomo, são a minha proteção e o meu desafio.

Resumo

Utilização da levedura como sistema de produção de uma proteína da cápside de um novo norovirus canino

Os norovirus (NoV) são actualmente reconhecidos como uma das causas mais comuns de surtos de origem alimentar de gastroenterite aguda e esporádica. Embora as vias de transmissão mais importantes sejam o contacto entre pessoas e o consumo de alimentos contaminados surgiu, ainda recentemente, a possibilidade de ocorrer também uma transmissão zoonótica.

A descoberta de um novo NoV canino no norte de Portugal e o potencial risco de transmissão zoonótica motivaram a investigação da ecologia deste vírus. A inexistência de um teste serológico comercial e a sua importância para a pesquisa em curso levou-nos a tentar implementar um ensaio imunoenzimático. Para implementar este ensaio são necessárias quantidades significativas de VLP's (*virus-like particles*) para serem utilizadas como antigénios. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido amplamente utilizada na produção de proteínas virais, incluindo proteínas da cápside. Assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar o sistema de elevada expressão e baixo custo de *S. cerevisiae* para produzir a proteína da cápside do novo NoV canino, VP1 (que forma espontaneamente VLP's), em quantidades suficientes para ser utilizada como antigénio no ensaio imunoenzimático. Com este objetivo, o gene VP1 foi inserido num vetor multicópia para expressão em levedura e a proteína foi fundida com um *tag* 6HIS no terminal C'. A inserção do *tag* 6HIS permite não só a deteção e quantificação da proteína recombinante por Western Blot, mas também, e sobretudo, a purificação da proteína VP1 num único passo por cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC). A produção da proteína VP1 na levedura foi otimizada para a estirpe e para as condições de crescimento e a purificação foi realizada por IMAC e analisada por coloração do gel com azul de Coomassie e Western Blot. O produto obtido corresponde a uma massa molecular esperada de 63 kDa e o rendimento obtido foi de 1,38 mg/g de peso húmido de levedura. As propriedades imunológicas da proteína recombinante VP1-6HIS foram avaliadas através da realização de um ensaio imunoenzimático e a sua antigenicidade demonstrada ao confirmar a serologia de várias amostras caninas. Encontram-se em curso estudos de microscopia eletrónica para avaliar se a proteína produzida é capaz de formar VLP's.

Em conclusão, neste trabalho implementamos um sistema rápido e eficiente para a produção e purificação da proteína VP1 da cápside do novo NoV canino.

Abstract

Using yeast as a production system of a new canine norovirus capsid protein

Norovirus (NoVs) are now recognized as the most frequent cause of foodborne outbreaks of acute gastroenteritis and the most common cause of sporadic enteric illness. Though the most important modes of transmission are person-to-person contact and consumption of contaminated food, zoonotic transmission has been recently suggested. Several studies have found evidence of human infections by strains of cattle and infections of pigs for human NoVs.

The discovery of a new NoV canine in the north of Portugal and the potential risk of zoonotic transmission compelled to explore the ecology of this virus. The absence of a commercial serological test VLP (virus-like particle)-based Enzyme Immunoassay (EIA) and its importance to the ongoing research has led us to implement an in-house EIA. To establish this assay, it was necessary a substantial number of VLP's to be used as an antigen. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been widely used for the production of viral proteins, including capsid proteins. Hence, the aim of this work was to use *S. cerevisiae*, as a cost-effective and high-level expression system, to produce sufficient amounts of the novel NoV capsid protein, VP1 (which self-assembles into VLP's), to be used as antigen in the in-house EIA assay. With this goal, the VP1 gene was cloned into a multicopy yeast expression vector and the protein was fused, at the C' terminus, to a 6HIS tag. The 6HIS tag allows not only the detection and quantification of recombinant proteins in Western Blot, but also, and most importantly, to perform a one-step purification of VP1 by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). The production of VP1 in yeast was optimized for the strain and growth conditions used and the purification performed by IMAC was analyzed by Coomassie blue staining of SDS-PAGE and Western Blot. The obtained product corresponded to an expected molecular weight of 63 kDa and the yield obtained was 1,38 mg/g wet weight of yeast. The immunological properties of the recombinant VP1-6His protein were evaluated by in-house EIA and its efficiency proved by confirming the serology of several canine samples. Studies of electron microscope are under way to evaluate if this VP1 is able to form VLP's.

In conclusion, in this work we present a fast and efficient system of production and purification of the canine NoV VP1 capsid protein.

Índice

Declaração -----	iii
Agradecimentos -----	iv
Resumo -----	v
Abstract -----	vi
Abreviatura -----	vii
Índice de figuras -----	x
Índice de tabela -----	xi
CAPÍTULO I – Introdução -----	1
1.1. Norovirus -----	2
1.1.1. Classificação dos norovirus -----	2
1.1.2. Genoma e replicação -----	4
1.1.3. Importância clínica -----	5
1.2. <i>Virus-like particles</i> -----	6
1.3. Produção de <i>Virus-like particles</i> -----	8
1.3.1. Sistemas de produção de <i>Virus-like particles</i> -----	8
1.3.2. Estratégias de clonagem e purificação -----	10
1.3.2.1. Estratégias de clonagem -----	10
1.3.2.2. Estratégias purificação -----	11
1.4. Objetivos do trabalho -----	13
CAPÍTULO II – Material e Métodos -----	14
2.1. Estirpes e condições de crescimento -----	15
2.2. Meios de cultura e condições de crescimento -----	15
2.3. Transformação de <i>S. cerevisiae</i> -----	16
2.4. Construção do vetor de expressão da proteína da cápside (VP1) -----	16
2.4.1. Construção do vetor de entrada (pDONR222-VP1) -----	17
2.4.2. Construção do vetor de expressão (pAG426GAL-VP1) -----	19
2.5. Western Blot -----	20
2.6. Purificação da proteína viral VP1 -----	22
2.7. Análise SDS-PAGE -----	23
2.8. Diálise -----	24

2.9. ELISA das VP1 produzidas em levedura -----	24
CAPÍTULO III – Resultados -----	26
3.1. Construção do vetor de expressão da proteína da cápside (VP1) -----	27
3.1.1. Construção do vetor de entrada (pDONR222-VP1) -----	27
3.1.2. Construção do vetor de expressão (pAG426GAL-VP1) -----	30
3.2. Análise da expressão da proteína da cápside (VP1) na levedura e otimização das condições de crescimento -----	32
3.2.1. Expressão da proteína VP1 na levedura -----	32
3.2.2. Otimização das condições de crescimento -----	33
3.3. Purificação da proteína viral VP1 -----	34
3.3.1. Escolha das colunas de purificação -----	34
3.3.2. Diálise -----	38
3.4. Implementação do ensaio ELISA das VP1 produzida em levedura -----	39
CAPÍTULO IV – Discussão e perspectivas futuras -----	41
CAPÍTULO V – Referências bibliográficas -----	46
Anexos -----	65

Índice de figuras

Figura 1. Organização do genoma de norovirus em função das proteínas e dos domínios da cápside. -----	4
Figura 2. Replicação de um vírus de RNA. -----	5
Figura 3. Representação esquemática da estrutura dos primers. -----	17
Figura 4. Visualização em gel de agarose 0,8% dos produtos de amplificação do PCR (gene VP1 flanqueado pelos locais attB). -----	28
Figura 5. Reacção de clonagem BP. -----	29
Figura 6. Análise do padrão de restrição do vetor de entrada (pDONR222 + VP1). -----	30
Figura 7. Reação de clonagem LR. -----	31
Figura 8. Análise por padrão de restrição dos clones de expressão (426+VP1) em gel de agarose 0,8%. -----	32
Figura 9. Expressão da proteína VP1 (fundida no terminal C' um <i>tag</i> de 6HIS). -----	33
Figura 10. Expressão da proteína VP1 (fundida no terminal C' com o <i>tag</i> 6HIS). -----	34
Figura 11. Otimização das condições de purificação da proteína viral VP1. -----	35
Figura 12. Comparação da cultura que expressa a proteína da cápside VP1 com a cultura que expressa apenas o vetor vazio (controlo negativo). -----	37
Figura 13. Comparação da expressão da proteína da cápside VP1 na estirpe selvagem e interrompida para o gene <i>Pep4</i> (<i>pep4Δ</i>). -----	38
Figura 14. Imagem ilustrativa dos principais passos do processo de produção da proteína recombinante (VP1) a partir de células de levedura. -----	43

Índice de tabelas

Tabela 1. Distribuição dos norovirus por genogrupos e genótipos segundo as diferentes espécies animais -----	3
Tabela 2. Vantagens da utilização de sistemas de expressão de levedura -----	9
Tabela 3. Genótipos das estirpes de <i>S. cerevisiae</i> e <i>E. Coli</i> usados neste estudo--	15
Tabela 4. Especificidade dos soros caninos e proteína VP1 do norovirus obtido em levedura e em inseto (baculovirus) -----	40

CAPÍTULO I

Introdução

1.1. Norovirus

Os norovirus são vírus RNA de cadeia simples com cápside icosaédrica, diâmetro de 27-30 nm (Koopmans e Duizer, 2004).

Em 1929, Zahorsky descreveu pela primeira vez a “*Hyperemesis hemis*” ou “*Winter vomiting disease*”, como sendo uma doença caracterizada pelo aparecimento súbito de vômitos e diarreia (Zahorsky, 1929). Em 1972, Kapikian e colegas identificaram uma partícula viral por imuno-electromicroscopia (IME) em amostras de fezes provenientes de um surto de gastroenterite ocorrido numa escola primária em Norwalk, EUA (Adler *et al.*, 1969; Kapikian *et al.*, 1972). Através da análise dos anticorpos específicos de indivíduos infectados, foi demonstrado que a partícula viral era o agente etiológico do surto de gastroenterite de Norwalk. Assim, este vírus ficou conhecido por vírus Norwalk (Kapikian *et al.*, 1972; Kapikian, 2000; Farkas *et al.*, 2008).

1.1.1. Classificação dos norovirus

O vírus Norwalk e os vírus que foram sendo descobertos e que devido às suas semelhanças foram denominadas por “*Norwalk - like virus*” foram originalmente descritos como pertencendo às famílias *Picornaviridae* e *Parvoviridae*, com base no aspecto morfológico das partículas viricas por microscopia eletrônica. Entretanto, após análise de uma das suas proteínas estruturais foi proposta a sua integração na família *Caliciviridae* (De Palma *et al.*, 2008). Em 1990, com a clonagem do genoma do vírus Norwalk confirmou-se a sua integração na família *Caliciviridae*, nome que deriva da palavra latina “*calix*” devido às depressões em forma de cálice observáveis na superfície da cápside (Atmar e Estes, 2001). Em 2002, o Comité Internacional de Taxonomia dos Virus (ICTV) que os vírus previamente denominados *Norwalk-like* ou SRSVs (*small round structured viruses*) fossem agrupados no género *Norovirus* (David e Szucs, 2003). Atualmente, a família *Caliciviridae* está dividida em quatro géneros: *norovirus* (ou vírus de Norwalk - NoV), *vesivirus*, *lagovirus* e *sapovirus* (Mayo, 2002), tendo recentemente sido sugerido mais um género, o *becovirus* (Oliver *et al.*, 2006).

A estirpe do NoV foi constituída com base na sequência nucleotídica do gene que codifica para a principal proteína da cápside, denominada VP1. Assim, foram designados três níveis de acordo com a identidade: estirpe (0 - 14,1%), genótipo (14,3 - 43,8%) e genogrupo (44,9 - 61,4%). Na estirpe de NoV, existem cinco tipos de genogrupos (GGI, GGII, GGII, GGIV, GGV), que posteriormente deram origem a pelo menos 28 grupos

genéticos ou genótipos (Zheng *et al.*, 2006). Os genogrupos apresentam pelo menos mais de 60% da identidade nos aminoácidos da proteína VP1 e em cada agrupamento genético ou genótipo encontramos mais de 80% de identidade na sequência de nucleótidos codificantes para a VP1 (Green *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2006). Os NoVs responsáveis por infeções em humanos, encontram-se associados aos genogrupos GGI, GGII e GGIV, enquanto os NoVs detectados em cães, por exemplo, pertencem ao grupo GGIV (tabela 1) (Martella *et al.*, 2008).

Tabela 1. Distribuição dos norovirus por genogrupos e genótipos segundo as diferentes espécies animais.

Norovirus					
Genogrupos e genótipos do norovirus					
Hospedeiro	GGI	GGII	GIII	GGIV	GGIV
Humano	1-8	1-10, 12-17		1	
Porco		11, 18, 19			
Gato			1,2		
Leão				2	
Cão				2	
Rato					1

Os norovirus apresentam um elevado grau de variabilidade genética. Dentro do mesmo grupo encontramos uma variabilidade de 45 - 61% no gene que codifica para a cápside (VP1). Dentro do genótipo este gene difere 14 - 44% e dentro da mesma estirpe as diferenças no genótipo variam entre 0 - 14% (Zheng *et al.*, 2006). A variação no genótipo para este vírus é elevada, mesmo em comparação com outros vírus de RNA. Este elevado grau de variabilidade é um fator que dificulta a imunidade a infeções por norovirus (Karst, 2010).

1.1.2. Genoma e replicação

O genoma dos norovirus é constituído por RNA de cadeia simples, de polaridade positiva com um tamanho entre 7,5 - 7,7 kb. Este genoma apresenta três sequências codificantes (ORFs “open reading frame”) (Glass *et al.*, 2000; Muller *et al.*, 2007) (Figura 1). A ORF1 na extremidade 5' representa cerca de 60% do genoma viral e codifica uma poliproteína (1789 aminoácidos) de massa molecular de 193,5 kDa; sofre clivagem proteolítica para produzir as proteínas não estruturais (Ettayebi e Hardy, 2003; Belliot *et al.*, 2003; Karst, 2010). A ORF2 codifica a maior proteína estrutural da cápside VP1 (Glass *et al.*, 2000; Mesquita, 2010). A ORF3 localiza-se na extremidade 3' e codifica a proteína da cápside VP2. A cápside, com a sua estrutura tridimensional icosaédrica é constituída por 180 cópias da proteína VP1 organizadas em dímeros, e uma a duas cópias da proteína VP2 (Karst, 2010; Hardy, 2005). A estrutura da proteína VP1 varia entre 530 e 555 aminoácidos correspondentes a uma massa molecular entre 53 e 63 kDa, respetivamente (Liu *et al.*, 1999; Oliver *et al.*, 2003). A proteína é constituída por dois domínios, o S (*shell domain*) conservado na região terminal N' (225 aminoácidos), e o P (*protruding*) (226-522 aminoácidos) que envolvem uma região central variável (Hardy, 2005; Prasad *et al.*, 1999). O domínio P, pode ser subdividido em P1 e P2, sendo o primeiro formado pelos lados em forma de arco e o segundo localizado nos topos expostos (Karst, 2010, Khan *et al.*, 2009). O domínio S do gene VP1 é uma região crítica na formação espontânea da cápside (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2002) (figura 1).

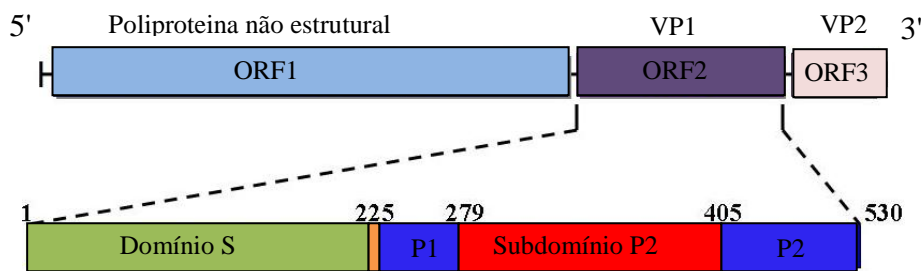


Figura 1. Organização do genoma de norovirus em função das proteínas e dos domínios da cápside. O genoma inclui a ORF1 que codifica uma poliproteína que após clivagem de 6 proteínas não estruturais, a ORF2 que codifica a proteína estrutural da cápside VP1 e a ORF3 que codifica a menor proteína estrutural VP2 [adaptado de (Khan *et al.*, 2009)].

A proteína VP2 tem entre 208 e 268 aminoácidos correspondendo a um peso molecular entre 22 e 29 kDa, respectivamente. Embora a sua função ainda não esteja completamente esclarecida, pensa-se que a VP2 interage com o RNA genómico, facilitando a sua inserção na cápside durante a formação do virião (Green, 2007; Glass *et al.*, 2003).

A replicação do norovirus ocorre no citoplasma das células infetadas e a sua principal característica é a produção de RNA subgenómico pequeno, que abrange a extremidade 3' do genoma contendo o gene da cápside (Meyer *et al.*, 1991). O RNA subgenómico é depois empacotado na partícula viral, sendo empacotado separadamente do viriãõ contendo o genoma, visto que ambos podem ser separados por um gradiente de centrifugação (Thiel e Konick, 1999). O processo de maturação e libertação da partícula viral não está completamente esclarecido (Figura 2) (Green, 2007).

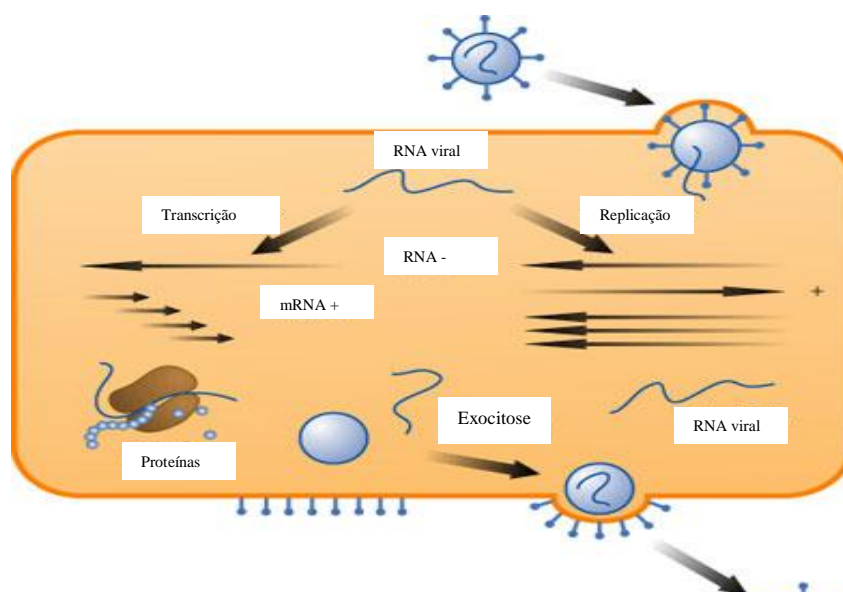


Figura 2. Replicação de um vírus de RNA (adaptado de www.scq.ubc.ca/viral-infection/).

1.1.3. Importância clínica

Os são hoje considerados a principal causa dos surtos epidémicos de gastroenterite aguda transmitido pelos adultos e uma causa importante da gastroenterite esporádica em todos os grupos etários (Glass *et al.*, 2009, Patel *et al.*, 2009). Uma das características da infecção por norovirus é a dimensão dos surtos epidemios, sendo responsáveis por mais

de 90% das gastroenterites virais e 50% dos surtos em todo o mundo (Lopman *et al.*, 2003; Reuter *et al.*, 2005; Duynhoven van *et al.*, 2005; Ike *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2009).

Os NoVs são classificados como agentes biológicos de classe B devido à sua elevada infecciosidade e rápida transmissão entre humanos (Hutson *et al.*, 2004; Estes *et al.*, 2006). A propagação dos NoV é facilitada pelas infecções assintomáticas, imunidade de curta duração, baixa dose infetante (apenas 17 partículas viral), excreção viral durante a convalescença e presença continuada nas fezes mesmo após o desaparecimento dos sintomas. A transmissão do NoV é também difícil de controlar através das medidas sanitárias dos hospitais já que são vírus extremamente resistentes aos agentes físicos e químicos. O NoV sobrevive a níveis elevados de cloro (até 10 p.p.m.) utilizados na desinfecção das águas e apresenta resistência a temperaturas extremas (congelamento e aquecimento a 60°C) (Teunis *et al.*, 2008; Patel *et al.*, 2009).

O NoV transmite-se de forma muito específica de pessoa-a-pessoa, o que propicia que casos primários se transformem em surtos após o consumo de alimentos contaminados (frutas, verduras, legumes frescos e frutos do mar ingeridos crus ou mal cozinhados), ingestão de água contaminada (de lagos, abastecimento de cidades, armazenada por navios, entre outros) (Estes *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2009). Vários estudos encontraram evidências de infecções humanas por estirpes bovinas (Widdowson *et al.*, 2005) e infecções de porcos por NoVs humanos (Farkas *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Mattison *et al.*, 2007). A possibilidade de ocorrência de estirpes de NoV recombinantes com virulência alterada é assim elevada. Em geral, a propagação zoonótica pode ocorrer indiretamente através da cadeia alimentar ou através do contacto direto com o animal (Meslin *et al.*, 2000).

1.2. *Virus-like particles*

Virus-like particles (VLP's) são partículas virais morfologicamente indistinguíveis dos viriões icosaédricos, mas desprovidas do material genético do vírus (RNA ou DNA viral). Sendo assim, as VLP's não se conseguem replicar dentro das células, sendo não infecciosas (White *et al.*, 1999; Lima e Mota, 2003).

Os NoVs, não são cultiváveis em cultura celular, e assim a produção de VLP's ganhou importância na impossibilidade de obter vírus em quantidades suficientes. As

VLP's são constituídas muitas vezes por uma única proteína recombinante que compõe a estrutura da cápside e apresentam epítomos conformacionais (Lindesmith *et al.*, 2003).

Nos anos 90, a expressão da proteína da cápside de um vírus, formando VLPs em sistemas de produção de insectos foi considerada uma estratégia segura, com uma elevada resposta imune e sem riscos adicionais (Kirnbauer *et al.*, 1993).

A principal característica das VLP's é a manutenção da estrutura viral, conservando os antígenos virais (proteína da cápside) as propriedades de ligação dos viriões para o NoV nativo, pelo menos em termos de associação aos hidratos de carbono (Karst, 2010). As VLP's podem ser armazenadas a -20°C por um longo período de tempo (mais de 6 meses) e resistem a condições adversas, como baixos valores de pH (Hunt *et al.*, 2005), sem perder a sua função biológica, sendo uma característica favorável ao fabrico de vacinas com VLP's (Karst, 2010).

As VLP's têm uma elevada quantidade de aplicações, tais como a terapia génica ou molecular (permitido o desenvolvimento de novos sistemas de vetores de transporte da molécula terapêutica até as células alvo), estudos de interações das proteínas com a célula hospedeira, tais como a identificação de recetores celulares (Hutson *et al.*, 2003; White *et al.*, 1996) e a aplicação em métodos de diagnóstico (Mena *et al.*, 2005). O principal método de diagnóstico é o ensaio imunoenzimático (ELISA) que é capaz de detectar o antígeno viral, utilizando o soro obtido pela imunização com as VLP's recombinantes em ratos, coelhos, entre outros. Os soros hiper-ímmunes demonstraram ser altamente específicos para estirpes homólogas de NoV pertencentes ao mesmo genótipo (Graham *et al.*, 1994).

O desenvolvimento de vacinas com VLP's estimula a formação de anticorpos pelo sistema imunitário de forma eficiente e sem o risco de infeção ou oncogénico (Bundya e Swartz, 2011). As vacinas constituídas por VLP's apresentam a vantagem do baixo custo, elevada estabilidade, elevada eficácia necessitando de doses mais baixas de antígeno em relação às vacinas atenuadas (Noad e Roy, 2003; Zheng *et al.*, 2006; Patrick *et al.*, 2008; Hutih *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, as VLP's têm sido amplamente utilizadas na nanotecnologia (Mena *et al.*, 2005), com a possível formação de nanopartículas magnéticas na qual se encontram ligados os antígenos com o agente terapêutico (VLP's), de modo a reconhecer as células infetadas. Esta nova tecnologia permite uma melhor eficiência e especificidade da ação da molécula terapêutica, quer na produção de novos fármacos, com atuação apenas nas células alvo (Perez *et al.*, 2003). Assim, a construção destas nanopartículas

apresenta vantagens relativamente à transferência de genes. Estas nanopartículas permitem manter as propriedades específicas dos vírus no que se refere à capacidade de entrar em células específicas e transferir as VLP's (Costa *et al.*, 2007).

1.3. Produção de *Virus-like particles*

1.3.1. Sistemas de produção de *Virus-like particles*

A formação de VLP's pode ocorrer apenas a partir da expressão da proteína da cápside VP1 que forma a estrutura tridimensional. Os sistemas de produção devem permitir a obtenção das proteínas recombinantes em elevada concentração, de modo a maximizar a sua agregação em VLP's (Bundy e Swartz, 2011).

As proteínas recombinantes que levam à formação de VLP's podem ser expressas em diversos sistemas, como em bactérias, insetos, leveduras, mamíferos ou plantas. A qualidade, funcionalidade, rapidez de produção e rendimento da proteína são fatores importantes a ter em conta na escolha do sistema de expressão (Baneyx e Mujacic, 2004).

Nas bactérias a expressão das proteínas virais é simples e com um elevado rendimento. No entanto, não se verifica a formação da estrutura tridimensional da proteína que permite a formação das VLP's. Tal pode dever-se à não ocorrência em *E. coli* de processos de glicosilação ou de modificações pós-tradução, por vezes essenciais à formação da estrutura secundária, terciária e quaternária (Daly e Hearn, 2005).

A produção de VLP's em insetos, assim como em mamíferos, apesar de ser eficaz é demorada e relativamente cara. Por outro lado, o rendimento das proteínas recombinantes para algumas estirpes de NoV é baixo e em alguns casos, a estrutura das VLP's não chega a formar-se (Xia *et al.*, 2007).

A expressão de VLP's na levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta vantagens na produção, custo, eficácia e adaptação do crescimento a fermentadores de larga escala. Adicionalmente, a probabilidade de contaminação destas culturas por toxinas ou vírus infecciosos é baixa em comparação com sistemas de produção de bactérias e células de mamífero (Park *et al.*, 2008). Representa, assim, um sistema eficiente no desenvolvimento de testes de diagnóstico, dado nestes testes ser necessária uma quantidade substancial de VLP's (Park *et al.*, 2008).

Os sistemas eucariotas, como o da levedura *S. cerevisiae*, apresentam em relação às bactérias a vantagem das proteínas intracelulares sintetizadas poderem ser secretadas para

o meio extracelular (Gellison *et al.*, 1992; Daly e Hearn, 2005). No entanto, algumas proteínas glicosiladas funcionam sem o carboidrato, como por exemplo o interferão, podendo desta forma ser produzidas em bactérias (Rinderknecht *et al.*, 1984). As principais vantagens da utilização de leveduras, encontram-se resumidas na tabela 2 (Demain e Vaishnav, 2009).

Tabela 2. Vantagens da utilização de sistemas de expressão de levedura.

- Alto rendimento
- Estirpes com elevada estabilidade em processos fermentativos
- Custo efetivo baixo
- Rápido crescimento em meios quimicamente definidos
- Processamentos celulares conservados com os mamíferos
- Produção de proteínas com ligações ricas em pontes bissulfureto
- Assistência ao enrolamento proteico
- Capacidade de glicosilar as proteínas

Até à data já foram expressas em levedura mais de 30 proteínas da cápside e do invólucro de diferentes vírus. As proteínas expressas dos diferentes vírus, depois da agregação em estruturas altamente organizadas formando a estrutura tridimensional, conduziram à formação espontânea das VLP's (Deml *et al.*, 2005). As VLP's recombinantes derivadas de vários vírus expressas em leveduras, quando administradas por via oral a ratos, coelhos, cães e gado bovino induzem uma resposta imune significativa, prevenindo infeções causadas por estes vírus (Xia *et al.*, 2007) (Mandic e Vujkov, 2004; Villa, 2003). Alguns exemplos de sucesso de produção de VLP's a partir de uma proteína viral, foram o da hepatite B (HBV) em 1986, e o do vírus do papiloma humano (HPV) em 2006. A produção de HPV em levedura esteve na base da primeira vacina no mercado contra o cancro cervical (único cancro 100% atribuído à infeção por vírus), e contra HIV (vírus humano imunodeficiente) (em ensaios clínicos na Bélgica) (Peixoto *et al.*, 2007). Assim, concluímos que o sistema de expressão da levedura é seguro, simples e eficaz na produção de VLP's capazes de ativar a resposta imunogénica (Xia *et al.*, 2007).

1.3.2. Estratégias de clonagem e purificação

1.3.2.1. Estratégias de clonagem

Atualmente existem dois grandes sistemas de clonagem, a clonagem clássica e as novas abordagens que envolvem técnicas de recombinação homóloga do DNA. A clonagem clássica envolve a inserção de DNA em vetor com recurso a enzimas de restrição e a uma enzima ligase, de modo a ligar as extremidades livres do DNA e a formar um vetor recombinante. Estas enzimas clivam e digerem as regiões dentro das sequências de DNA, originando na maioria dos casos extremidades coesivas permitindo assim inserção dos genes nos vetores. Assim, é imprescindível a digestão tanto dos vetores como dos genes com enzimas que formem extremidades compatíveis (Hunt, 2005). Tal clonagem apresenta dificuldades na ineficiência de digestão dos vetores e dos produtos de PCR devido a uma disponibilidade limitada dos locais de restrição (Hunt, 2005).

Nos últimos anos, vários sistemas de clonagem tentaram contornar as limitações associadas aos sistemas tradicionais de construção de vetores. O sistema mais utilizado é o da Gateway (Hartley *et al.*, 2000), baseado na recombinação do bacteriófago lambda para facilitar a transferência de sequências de DNA entre dois vetores (Landy, 1989; Alberti *et al.*, 2007). Esta recombinação ocorre através das sequências específicas designadas locais de *attachment* (*att*) (*attL*, *attR*, *attB* e *attP*), presentes na bactéria e no bacteriófago, e catalisada por uma mistura de enzimas (*clonase LR* e *BP*) tornando a reação eficiente rápida, direcional e específica (Alberti *et al.*, 2007). Este sistema permite transferir uma ou mais sequências de DNA para vetores múltiplos em reações paralelas mantendo a orientação e a fase de leitura, eliminando a necessidade de re - sequenciação. A única limitação reside no facto de esta técnica necessitar de preparação específica dos vetores de expressão (inserção dos locais *att*) (Walhout *et al.*, 2000; Alberti *et al.*, 2007).

A escolha do vetor de expressão adequado depende do hospedeiro e da aplicabilidade das proteínas recombinantes. Nas leveduras, os principais vetores existentes para a expressão proteica são os integrativos, os centroméricos e os epissomais ou 2 μ m. Os integrativos replicam integrando-se por recombinação homóloga no genoma da célula hospedeira, levando normalmente à inserção de apenas uma cópia do plasmídeo na levedura, e sendo mais estáveis. Os centroméricos (YCp) são plasmídeos com replicação autónoma, com uma sequência centromérica responsável pelo baixo número de cópias. Os plasmídeos epissomais, contêm o plasmídeo selvagem da levedura (o 2 μ m

inteiro ou sequências que servem de origem de replicação, ORI, derivadas do 2 μ m), permitindo a presença de um número elevado de cópias e de uma frequência elevada de transformação das leveduras (Brown, 2006; Sopko *et al.*, 2006).

1.3.2.2. Estratégias de purificação

A purificação proteica é geralmente a parte mais complexa da produção proteica. Esta purificação pode ser realizada por diferentes métodos de concentração ou cromatografia. Nos métodos de concentração podemos utilizar, por exemplo, a precipitação com sais inorgânicos, solventes orgânicos, ou polímeros, assim como a ultracentrifugação (Baneyx *et al.*, 2004). Na purificação por cromatografia em gel de filtração (separação pela massa molecular utilizando géis com um grau de porosidade definida), a separação das proteínas não requer o gasto de energia, sendo os sistemas simples de otimizar e com altas taxas de recuperação. No entanto, não permitem a purificação de grandes quantidades de amostras (1 - 2% do volume total da coluna), e apresenta problemas de diluição da proteína para a eluição purificada (Patrick *et al.*, 2008).

A purificação por cromatografia de troca iónica, baseia-se na carga da proteína que estamos a tentar isolar. Se esta possuir carga positiva, a solução deve passar por uma coluna com carga negativa (impedindo a passagem das proteínas com carga positiva). A afinidade da proteína depende do pH do meio (dado este alterar a carga das proteínas), da temperatura, da força iónica, da natureza do tampão entre outros. Na eluição é utilizada uma solução com elevada concentração de sal, que compete com a ligação da proteína a coluna. A remoção do sal tem de ser realizada por diálise (Alberts *et al.*, 2002).

As purificações em cromatografia de absorção baseiam-se na capacidade de algumas proteínas se unirem de forma não covalente com outras moléculas (ligando), localizados numa matriz de uma coluna adsorvente. Na ligação das proteínas, intervêm as forças de van de Waals, ligações de hidrogénio ou interações eletrostáticas (Silva *et al.*, 2000; Patrick *et al.*, 2008).

A cromatografia de afinidade baseia-se nas funções biológicas da proteína que se liga à coluna. Este é um método muito eficiente de purificação, uma vez que se baseia numa especificidade biológica da proteína que se pretende analisar, tal como a afinidade de uma enzima a um substrato (Alberts *et al.*, 2002).

As propriedades proteicas diferem muito de uma proteína para outra, o que exige a otimização da técnica de purificação para cada proteína, acarretando desvantagens em termos económicos. A aplicação de *tags* de afinidade nas proteínas recombinantes permite não só a deteção da proteína mas sobretudo a purificação num único passo, resultando num produto final com uma elevada pureza. Os *tags* trazem vantagens adicionais, como a prevenção da proteólise (Tang *et al.*, 1997), facilita a renaturação das proteínas (Shi *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2005), fornece proteção antigénica à proteína de fusão (Mayer *et al.*, 2004) e pode aumentar a solubilidade (Chen *et al.*, 2005; Nallamsetty, 2005). Como desvantagens, os *tags* podem interferir na conformação da proteína (Chant *et al.*, 2005), levando a uma alteração da atividade biológica (Fonda *et al.*, 2002) ou à toxicidade (Vries *et al.*, 2003), dependendo da localização dos aminoácidos do *tag* (Bucher *et al.*, 2002). A purificação de proteínas com *tags* baseia-se tipicamente nas características físicas resultantes da interação entre o *tag* e um ligando de cada proteína recombinante (como a estabilidade e hidrofobicidade), do sistema de expressão, bem como da aplicação da proteína purificada. Os *tags* mais comumente utilizados são: as polihistidinas (HIS), a glutationa S-transferase (GST), a proteína verde fluorescente (GFP) e *Maltose Binding Protein* (MBP) (Terpe, 2003).

Os *tags* de HIS são atualmente os mais utilizados na purificação de proteínas recombinantes, sobretudo porque são pequenos e raramente interferem com a função, atividade ou estrutura proteica. Os *tags* são compatíveis com o uso de desnaturantes como a ureia. O facto de o *tag* ser pequeno (3 - 8 histidinas) faz com que a remoção do *tag* não seja necessária ao contrário de outros *tags* maiores. Os *tags* de polihistidina apresentam uma elevada afinidade para quelatos de níquel e outros iões metálicos imobilizados num suporte sólido (por exemplo, Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} ou Co^{2+}) (Hage, 1999; Rubio *et al.*, 2005).

A técnica de cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC) é o método mais comum na purificação de proteínas com o *tag* de polihistidina. A purificação proteica por IMAC foi descrita por Poroth e colaboradores (Poroth *et al.*, 1975). Esta metodologia consiste na formação de um complexo entre um ião metálico e um agente quelante imobilizado que atua em função das interações dos resíduos de aminoácidos, principalmente de histidina (Porath, 1992). Consequentemente, a proteína ligada ao *tag* de polihistidina vai ligar-se seletivamente ao ião metálico enquanto outras proteínas celulares não se vão ligar, ligam-se de forma fraca, podendo ser removidas com tampões contendo competidores para o níquel.

As proteínas com *tags* de HIS apresentam maior afinidade para os íons Ni^{2+} , mas a intensidade de ligação pode ser afetada pela extensão do *tag*, pela posição do *tag* (na extremidade terminal N' ou C') e pelo pH dos tampões (Hage, 1999). Esta estratégia permite a purificação de proteínas com diferentes características, numa só etapa cromatografia, com elevada rapidez, com um elevado grau de pureza, um alto rendimento (superior a 90%) e reduzidos custos de produção (Arnold, 1991; Arnau *et al.*, 2006).

1.4. Objetivos do trabalho

Em 2007, a pesquisa de NoVs em cães levou à descoberta de um novo norovirus canino (Mesquita *et al.*, 2010). Esta descoberta, motivou o estudo deste vírus nesta espécie animal e também a avaliação do seu potencial zoonótico, dado tratarem-se de animais de companhia, com um contacto próximo do humano. A transmissão zoonótica tem ganho relevância junto da comunidade científica sobretudo depois da recente pandemia do subtipo de Influenza A (vírus H1N1), que resultou da recombinação de estripes animais e humanas (Smith *et al.*, 2009). A inexistência de um ensaio imunoenzimático comercial para detecção de anticorpos contra NoV canino esteve na base da presente tese. Para o desenvolvimento deste tipo de ensaio é necessária uma quantidade significativa da proteína viral da cápside VP1 (que forma espontaneamente VLP's) para serem utilizadas como antigénios. Neste trabalho, uma vez que os NoVs não são cultiváveis, utilizou-se a levedura como sistema de expressão da proteína viral VP1, a utilizar no ensaio imunoenzimático. Assim, foram objetivos deste trabalho:

- Clonagem do gene VP1 fundido com um *tag* (6HIS) no vetor de expressão pAG426GAL;
- Transformação da levedura *S. cerevisiae* com o vetor de expressão pAG426GAL-VP1 e seleção em meio seletivo;
- Análise da expressão da VP1 por Western Blot;
- Otimização das condições de crescimento (temperatura e fonte de carbono) para a obtenção de um melhor rendimento de produção;
- Purificação da proteína VP1 através do *tag* 6HIS por IMAC;
- Caracterização da proteína VP1 purificada quanto à sua antigenicidade em ensaios imunoenzimáticos.

CAPÍTULO II

Material e Métodos

2.1. Estirpes e condições de crescimento

Foram utilizadas neste estudo quatro estirpes de *S. cerevisiae* e uma de *E. Coli*, cujos genótipos estão representados na tabela 3.

Tabela 3. Genótipos das estirpes de *S. cerevisiae* e *E. Coli* usados neste estudo.

<u>Estirpes de <i>S. cerevisiae</i></u>	<u>Genótipo</u>
W303 1-A	<i>MATa, leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15</i>
By4743	<i>MATa/MATα his3Δ 0/his3Δ 0; leu2Δ /leu2Δ 0; met15Δ 0/MET15; LYS2/lys2Δ 0; ura3Δ 0/ura3Δ 0</i>
CG379	<i>MATα, ade5, his2, leu2-112, trp1-289, ura3-52</i>
W303-1B pep4Δ	<i>MATα, leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 pep4::HIS3 (Marques, et al., 2006)</i>
<u>Estirpe de <i>E. coli</i></u>	
DH5α (NEB)	<i>FhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>

2.2. Meios de cultura e condições de crescimento

As estirpes não transformadas da levedura *S. cerevisiae* foram cultivadas no meio de cultura YPD (*Yeast Peptone Dextrose*), composto por 2% (p/v) glucose (Sigma-Aldrich), 1% (p/v) bactopectona (Oxoid) e 1% (p/v) extracto de levedura (Oxoid). As culturas foram incubadas a 30°C com agitação constante de 170 r.p.m.

As estirpes de levedura transformadas com o vetor vazio pAG2426GAL e o plasmídeo com o gene que codifica para a proteína da cápside (VP1), pAG426GAL-VP1, foram incubadas em meio de cultura mínimo seletivo de glucose, composto por 2% (p/v) glucose, 0,17% (p/v) YNB (*yeast nitrogen base*) (Difco) e 2% (p/v) sulfato de amónio (Landilab). Para a indução da expressão da cápside (o plasmídeo contém o promotor indutível *GAL10*), no meio anterior, a glucose foi substituída por 2% (p/v) de galactose (Sigma-Aldrich). O meio foi suplementado com uma mistura de aminoácidos (50 μ g/ml; Sigma-Aldrich) (sem uracilo, marca de seleção do plasmídeo), para satisfazer os requisitos auxotróficos da estirpe.

Para a indução da expressão da proteína da cápside, as estirpes foram incubadas no meio de cultura contendo 1% (p/v) galactose, 0,17% (p/v) YNB, 2% (p/v) sulfato de amônia, 1% (p/v) rafinose (Sigma-Aldrich) e 3% (p/v) glicerol (Sigma-Aldrich), a 28°C com agitação constante de 170 r.p.m. até uma DO_{600} 0,5-0,6 ($1-2 \times 10^7$ células/ml fase máxima de produção das proteínas recombinantes).

O crescimento de *E. coli* foi realizado em meio de cultura LB (*Luria Broth*) contendo 1,0% (p/v) bactopectona, 0,5% (p/v) extrato de levedura, 0,5% (p/v) cloreto de sódio, a pH 7,0. No caso dos meios sólidos, foi adicionado ao meio anterior 2% (p/v) agar (Oxoid).

2.3. Transformação de *S. cerevisiae*

A transformação foi feita segundo Gietz e Schiestl (2007). Resumidamente, um pré-inoculo da cultura foi diluída em meio de YPD e a cultura incubada até atingir uma $DO_{600} = 0,5$ ($1-2 \times 10^7$) células/ml. As células foram recolhidas e lavadas duas vezes com água destilada estéril. Adicionou-se ao pellet uma mistura contendo 240 μ l da solução estéril de PEG (polietileno glicol) contendo 50% (p/v) PEG-4000, 36 μ l de acetato de lítio (1,0 M, pH 7,5), 50 μ l de DNA de cadeia simples ($2,0 \text{ mg/ml}^{-1}$) previamente preparado (ciclos de 5 min em água fervente e gelo) e 7 μ l de DNA plasmídico. De seguida, a suspensão celular foi colocada num banho a 42°C, sem agitação, durante 30 min. As células foram recolhidas, ressuspensas em água estéril e plaqueadas em meio glucosado seletivo (sem o aminoácido uracilo). As placas foram incubadas numa estufa a 30°C durante 3 dias.

2.4. Construção do vetor de expressão da proteína da cápside (pAG426GAL-VP1)

A construção do vetor de expressão em levedura da proteína VP1 realizou-se utilizando o sistema de clonagem da Gateway (Invitrogen; Hartley, Temple *et al.*, 2000), composto por duas reações. A reação BP que medeia a inserção de um produto de PCR (reação em cadeia da polimerase) contendo o gene de interesse flanqueado pelas sequências attB no vetor pDONR222, criando o designado vetor de entrada. A reação LR medeia a passagem do gene de interesse do vetor de entrada para o vetor de destino criando assim o vetor de expressão desejado.

2.4.1. Construção do vetor de entrada (pDONR222-VP1)

Amplificação do gene VP1 flanqueado pelos locais de recombinação attB

O desenho dos primers específicos para a amplificação do gene VP1 foi baseado na sequência de RNA do norovirus disponível no *GenBank* (nº de acesso GQ443611.1). Os primers são constituídos pela sequência homóloga à região inicial ou terminal do gene a amplificar juntamente com as sequências attB1 e attB2 necessárias para a clonagem por recombinação da *Gateway* e foram desenhados seguindo as instruções do fabricante. De forma a fundir um *tag* de 6HIS no terminal C' da proteína VP1, a sequência codificante para as 6 histidinas foi incluída na sequência do *primer reverse* imediatamente antes do codão *stop* de tradução

5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAACCATGTTCTACCGCAGATTACTGCG3' e o *primer reverse* (RDV (HIS6)): 5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAATGATGATGATGATGATGAAGAATCTACATTCACAG3' (Figura 3). Os primers apresentam uma T_m (Temperatura de desnaturação) de respectivamente 85,4 e 90,8°C.

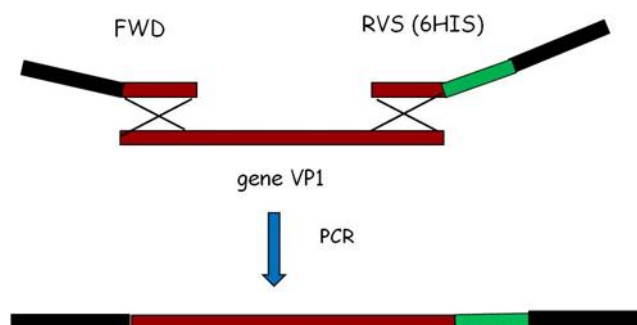


Figura 3. Representação esquemática da estrutura dos primers. Primers desenhados para a inserção das sequências att (representadas a preto) necessárias para a clonagem do gene VP1 (representado a vermelho) pelo método da Gateway, assim como para a inserção da cauda de 6 histidinas (6HIS) (representada a verde).

Preparação dos produtos de PCR

A reação de amplificação PCR, usando os primers específicos indicados na secção anterior, consiste num ciclo de 95°C durante 1 min, seguido por 30 ciclos de 95°C durante 45 seg, 52°C durante 45 min e 72°C durante 2 min, seguido pelo um ciclo de extensão a 72°C durante 10 min.

A reação de PCR foi realizada com a enzima *Taq DNA Polimerase* (Sigma-Aldrich). A mistura de PCR realizada é apresentada.

Análise eletroforética

Na análise dos fragmentos de DNA utilizou-se o gel de agarose 0,8%, em tina horizontal. A cada amostra adicionou-se tampão da amostra (Invitrogen). As amostras foram corridas no gel juntamente com um marcador de massa molecular (TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen). A eletroforese foi realizada a 100 V em tampão TAE contendo 2,42% (p/v) Tris, 0,57% (p/v) ácido acético, 18,6% (p/v) EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), a pH 7,6. O gel foi corado com brometo de etídeo (imersão numa solução de 0,5µg/ml durante 20 min) e posteriormente visualizado num transiluminador (Molecular Imager_Gel Doc™ XR, With Image Lab™ Software da BioRad).

Recuperação do DNA do gel de agarose

A recuperação do produto de PCR do gel de agarose foi realizada por excisão, com um bisturi, da banda (contendo o tamanho de 1744 pb) visualizada por exposição à luz ultra-violeta. A purificação do produto de PCR da agarose foi realizada utilizando um kit comercial e seguindo as instruções do fabricante (*QIAquick Gel Extraction*, Qiagen).

Recombinação entre os sítios attB e attP (reação BP)

A reação BP leva à recombinação dos sítios *attB* do fragmento linear do produto de PCR com os sítios *attP* do plasmídeo pDONR222. A recombinação resulta na entrada do gene VP1 no pDONR222 e saída simultânea do gene de seleção *cccd* (denominando-se vetor de entrada). A reação BP foi realizada utilizando o kit *Gateway® BP Clonase II Enzyme Mix* (Invitrogen) e otimizada para reduzir o volume total de reação de 20 µl para 5 µl. Num microtubo de 1,5 ml foram adicionados 3 µl do produto de PCR, 1 µl do vetor pDONR221 e 1 µl da mistura de enzima BP clonase II (Invitrogen). A mistura de reação foi homogeneizada e incubada sem agitação durante aproximadamente 12 horas, a 25°C. Seguidamente, a reação foi terminada adicionando 1 µl de Proteinase K (2µg/µl) e incubando a 37°C durante 10 min.

Transformação de *E. coli DH5 α*

A transformação de células competentes de *E. coli DH5 α* (NEB-5alpha) (Sigma-Aldrich) (sensíveis ao produto do gene *ccdB*) foi feita de acordo com as instruções do fabricante, mas com redução do volume final. Resumidamente, colocou-se 30 μ l de células competentes num microtubo de 1,5 ml, adicionou-se 4 μ l da mistura previamente preparada da reação BP e incubou-se 30 min no gelo. Seguidamente, incubou-se num banho a 42°C durante 30 segundos rigorosamente e colocou-se 5 min no gelo. A cada tubo adicionaram-se 300 μ l de meio SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*; Invitrogen) e colocado a incubar durante 1 hora a 37°C com agitação de 250 r.p.m. Seguidamente, 200 μ l desta suspensão foram plaqueados em meio de LB-agar suplementado com o antibiótico canamicina e as placas foram incubadas durante 24 horas a 37°C. O crescimento seletivo dos transformantes contendo o vetor de entrada ocorre devido ao facto de apenas as bactérias que integram o vetor de entrada serem capazes de crescer, já que as bactérias que integram o vetor pDONR222 não são capazes de crescer devido à manutenção do gene *ccdB*.

Extração e confirmação dos clones recombinantes

Os transformantes selecionados aleatoriamente foram crescidos em meio de LB líquido com canamicina durante aproximadamente 12 horas, a 37°C. A extração do DNA plasmídico foi feita utilizando um kit comercial (*QIAprep Spin Miniprep*, Sigma).

A confirmação da correta criação do vetor de entrada foi feita por análise do padrão de restrição. Num microtubo adicionaram-se 7,7 μ l do DNA extraído, 1 μ l de tampão da enzima, 1 μ l de BSA (Bovine Serum Albumin) e 0,2 μ l de enzima AflIII. A mistura foi incubada durante 2 horas a 37°C. Posteriormente, as amostras foram corridas em gel de agarose como descrito anteriormente.

2.4.2. Construção do vetor de expressão (pAG426GAL-VP1)

Recombinação entre os sítios attL e attR (reação LR)

A reação LR envolve a recombinação entre os sítios attL (do vetor de entrada, criado na reação BP) e os sítios attR (vetor de destino). O vetor de destino utilizado foi o pAG426GAL (Alberti *et al.*, 2007). A reação LR foi realizada utilizando o Kit da *Gateway LR Clonase II Enzyme Mix* (Invitrogen). Em cada microtubo de 1,5 ml

adicionaram-se 2 µl da mistura de DNA (vetor de entrada), 2 µl do plasmídeo pAG426GAL e 1 µl da mistura de enzima LR clonase II. A mistura foi devidamente homogenizada e incubada a 25°C durante aproximadamente 12 horas. A reação foi terminada pelo tratamento com 1 µl de Proteinase K a 37°C durante 10 min tendo-se realizado, seguidamente, uma nova transformação de *E. coli DH5α*. O crescimento dos transformantes realizou-se em placas com meio de LB agar com ampicilina, a 37°C durante 24 horas.

Transformação de *E. coli DH5α*

A transformação de células competentes de *E. coli DH5α* com a mistura da reacção LR realizou-se como descrito na secção, excetuando o facto da suspensão celular ser plaqueada em meio de LB-agar suplementado com o antibiótico ampicilina. A extração do DNA plasmídico realizou-se utilizando um kit comercial (*QIAprep Spin Miniprep*, Sigma).

Extração e confirmação dos clones recombinantes

A extração do DNA e confirmação dos clones recombinantes por análise do padrão de restrição realizou-se como descrito na secção anterior.

2.5. Western Blot

Extração e quantificação proteica total

Na extração das proteínas totais utilizou-se o método de lise alcalina (NaOH). A 500 µl de suspensão celular com aproximadamente 2×10^7 células/ml, adicionou-se 50 µl de tampão de lise (935 µl de 2N NaOH e 65 µl de β-mercaptoetanol) e incubou-se durante 20 min no gelo. A precipitação proteica foi efetuada com a adição de 55 µl de 3 M TCA (ácido tricloroacético) durante 15 min no gelo, com posterior centrifugação a 4°C durante 15 min a 12000 r.p.m. Com o objetivo de remover lípidos e membranas celulares, as células foram lavadas com 300 µl de acetona e centrifugadas a 12000 r.p.m. durante 15 min a 4°C. Finalmente, as proteínas foram ressuspensas em 20 µl de 2% SDS com 0,1 M NaOH e 20 µl de Laemmli Buffer, podendo ser armazenadas a -80°C.

A quantificação proteica foi feita pelo método de Bradford utilizando um kit de quantificação (*Comassie brilliant blue G solution* (Fluka); Sigma-Aldrich). As proteínas totais ligam-se ao corante azul de Coomassie (*Coomassie brilliant blue G solution*). A concentração proteica, analisada a uma absorvência de 595 nm, é determinada pelo traçado da curva de calibração com a proteína BSA (Bradford, 1976).

Separação proteica por eletroforese e transferência

Na análise das proteínas extraídas utilizou-se um gel de poliacrilamida a 10%, num aparelho de eletroforese vertical “*Mini-Protean II – Electrophoresis Cell*” (BioRad). As amostras foram fervidas durante 5 min a 99°C e carregadas no gel juntamente com o marcador de massa molecular “*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*” (Invitrogen). A eletroforese realizou-se a 100 V durante aproximadamente 1 hora.

As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad) com uma solução de transferência contendo 0,46% (p/v) Tris-base, 2,16% (p/v) glicina, 300 ml metanol e 1200 ml de H₂O_{UP} e uma corrente elétrica a 100 V, durante 2 horas a 4°C. A eficiência da transferência foi controlada corando a membrana de nitrocelulose com a solução de Ponceau S, sendo o corante removido com solução de tampão fosfato (PBS; *phosphate buffered saline*) contendo 8% (p/v) NaCl, 0,2% (p/v) KCl, 0,12% (p/v) KH₂PO₄, 0,91% (p/v) Na₂HPO₄, pH 7,4.

Deteção da proteína com anticorpos específicos

As membranas de nitrocelulose foram mergulhadas numa solução de bloqueio contendo 5% de leite em pó preparado em 1x TBS (6,06% (p/v) Tris-base, 8,79% (p/v) NaCl) com 0,05% Tween-20), durante 2 horas com agitação suave à temperatura ambiente. Para a deteção da proteína VP1, a membrana foi incubada com o anticorpo policlonal de coelho anti-HIS-tag (1:1000, MicroMol GmbH), e incubado durante aproximadamente 12 horas a 4°C com agitação suave. A membrana foi depois lavada 3 vezes com TBS com 0,05% Tween-20 durante 5 min e 1 vez durante 15 min (com agitação). Seguidamente procedeu-se a incubação da membrana durante 2 horas à temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado a uma peroxidase de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*) (1:5000; Santa Cruz Biotechnology).

Para quantificar a quantidade de proteína VP1, utilizou-se a proteína Pgk1 para normalizar a quantidade proteica total. Uma vez que a massa molecular da proteína é bastante distante da proteína VP1, procedemos apenas à lavagem da membrana com 1x TBS-Tween-20 antes de uma nova incubação com o anticorpo anti-PGK (1:6000; Molecular Probes), seguida de 1 hora de incubação com o anticorpo secundário anti-rato (conjugado com a HRP) (1:6000; Molecular Probes).

A detecção realizou-se por quimiluminescência, depois da incubação da membrana 5 min com um substrato enzimático quimiluminescência (*Amersham ECL plus Western Blotting detection System*, GE Healthcare). A quimiluminescência é então detestada por exposição a um filme fotográfico.

A quantificação das bandas foi efetuada utilizando o programa *Quantity One 1-D Analysis Software* (BioRad).

2.6. Purificação da proteína viral VP1

Crescimento da levedura e extração proteica total

O crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (W303 1A) foi realizado durante 24 horas a 28°C, com agitação de 170 r.p.m. até uma DO_{600} de 0,5-0,6 num volume final de 1800 ml. Posteriormente, a cultura foi recolhida e o peso húmido da cultura determinado. Para a digestão da parede celular das células adicionou-se a enzima Zimoliase (proporção igual ao pellet) (Powilleit *et al.*, 2007) na solução de tampão fosfato (50 mM fosfato de sódio, 5% glicerol) e 350 µl de 200 mM DTT (Bundy e Swartz, 2011). Incubou-se durante 2 horas a 37°C com agitação. A mistura foi novamente centrifugada 3 min a 4000 r.p.m. e a lise das células foi completado por agitação com esferas de vidro (0,4 mm de diâmetro) (proporção igual ao pellet) na presença de uma solução de lise composta por 50 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, pH 8,0, 5% glicerol, 1mM PMSF e inibidor de proteases (Xia *et al.*, 2007). A mistura foi agitada em vortex à velocidade máxima durante 5min, com um repouso em gelo de 5 min. Este processo foi repetido até à lise total das células. A separação das esferas de vidro do lisado celular foi realizada com 25 ml tampão de lavagem (4 M ureia, 20 mM tampão fosfato, 20 mM imidazole, pH 8,0) e deixou-se em contacto com as proteínas durante 20 min no gelo. Centrifugou-se a 6000 r.p.m. durante 1 hora a 4°C, e recolheu-se o sobrenadante.

Purificação da proteína VP1 por cromatografia de afinidade

Como parte da estratégia de produção da proteína VP1, esta foi expressa fundida com um *tag* de histidinas o que nos permitiu utilizar a cromatografia de afinidade como método de purificação proteica. Para o efeito utilizamos colunas comerciais de Ni²⁺ - Sepharose™ (GE Healthcare). O *tag* de 6HIS presente na proteína recombinante permite uma elevada afinidade com o ião Ni²⁺ (Kroll, 1993). Antes da utilização, as colunas foram lavadas com 3 ml de H₂O_{up} e equilibradas com 10 ml de tampão de ligação (6 M ureia, 20 mM tampão fosfato, 20 mM imidazole, pH 8,0). As amostras foram mantidas em contacto com os iões de Ni²⁺ durante 2 horas no frigorífico com agitação suave. A lavagem das colunas, após a ligação das proteínas é realizada por tampões de lavagem com 40mM de imidazole (6M ureia, 20mM tampão fosfato, 40mM imidazole, pH 8,0), de modo a remover as proteínas contaminantes. As proteínas com os *tag* de HIS, retidas nas colunas, são eluídas gradual e seletivamente através da passagem de um gradiente de concentração crescente de imidazole que compete com a proteína pela ligação ao ião Ni²⁺. A eluição ocorre com cerca de 3 ml de tampão de eluição (6 M ureia, 20 mM tampão fosfato e imidazole, pH 8,0). No sistema, o tampão de eluição foi composto por três concentrações diferentes de imidazole (300 mM, 500 mM e 1 M) que foram aplicadas sucessivamente, encontrando-se em contacto com a coluna 1 ml de cada vez, durante 15 min, a 4°C. As proteínas eluídas foram recolhidas e armazenadas a -20°C até análise por SDS-PAGE.

2.7. Análise por SDS-PAGE

As proteínas eluídas foram corrida em gel SDS-PAGE, e seguidamente o gel foi fixado com 15 ml de solução de fixação contendo 50% (p/v) de etanol em água ultra pura e 10% (p/v) de ácido acético, durante 1 hora à temperatura ambiente com agitação, sendo no final a solução removida por aspiração. Seguidamente o gel foi mergulhado com 15 ml de solução de lavagem contendo 50% (p/v) de metanol em água ultra pura e 10% (p/v) de ácido acético, com incubação durante aproximadamente 12 horas à temperatura ambiente com agitação suave. No final, a solução foi removida por aspiração.

Posteriormente, o gel foi mergulhado com 15 ml de azul Coomassie contendo 0,1% (p/v) azul Coomassie, 20% (p/v) metanol e 10% (p/v) ácido acético, e incubado durante 3

horas à temperatura ambiente com agitação. Para descorar removeu-se a solução de Coomassie por aspiração, e lavou-se o gel incubando com 15 ml da solução de lavagem à temperatura ambiente com agitação moderada. Prosseguiu-se com a descoloração até as bandas das proteínas serem visualizadas sem a coloração de fundo do gel.

2.8. Diálise

A amostra contendo a proteína recombinante foi dialisada de forma lenta, utilizando membranas de diálise de celulose (H1, 18mm, 50cm, 5k MWCO, 5µm) (Roth). Assim, as membranas foram cortadas e lavadas com água ultra pura durante 10 min (até remoção completa do preservante). Seguidamente, a uma das extremidades fechada foi adicionada a solução contendo a proteína VP1 purificada tendo-se depois fechado a outra extremidade da membrana. A membrana foi mergulhada com 75 ml de tampão de diálise (1x PBS com ureia), o qual foi, por sua vez, colocado num agitador e incubado durante aproximadamente 12 horas a 4°C. Substituiu-se o tampão várias vezes com concentrações decrescentes de ureia (6 M, 4 M, 2 M e 0 M) para permitir uma renaturação gradual. Por fim, removeu-se a amostra e a proteína foi quantificada pelo método de Bradford (descrito anteriormente).

2.9. ELISA das VP1 produzidas em levedura

Nos ensaios de ELISA, a proteína recombinante VP1 foi utilizada como antigénio numa suspensão com 5µg/ml de VLP's em tampão de revestimento. A cada poço das microplacas de polietileno de 96 poços (*Nunc-ImmunoTM Plate PolySorpTM Surface, NUNCTM Brand Products*) foram adicionados 50 µl da suspensão de VLP's diluídas em 50 µl de tampão carbonato bicarbonato a pH 9,6 (0.05 M de Na₂CO₃ e NaHCO₃, em H₂O_{UP}) e incubadas durante aproximadamente 12 horas a 4°C. Seguidamente, a placa foi lavada 3 vezes com aproximadamente 200 µl por poço de 1x PBS acertado a pH 7,4 com 0,005% Tween-20 (PBS/Tween 0,005%). Adicionou-se 200 µl de solução de bloqueio a cada poço e incubaram-se durante 2 horas a 37°C de modo a eliminar ligações inespecíficas que poderiam resultar em falsos positivos.

Posteriormente, a placa foi lavada novamente 3 vezes com PBS/Tween 0,005%. A cada poço foi adicionada 50 µl da diluição do soro (1:100) e solução de bloqueio. A placa de ELISA foi coberta e incubada durante 1 hora a 37°C. Procedeu-se à lavagem da placa durante 3 vezes com PBS/Tween 0,005%. Seguidamente, a cada poço da placa adicionaram-se 50 µl de anticorpo anti-cão conjugado com a HRP (1:6400; *Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.*, Gaithersburg, USA) preparado em solução de bloqueio (5% de leite em PBS/Tween 0,005%). As placas foram cobertas e novamente incubadas durante 1 hora a 37°C. Após lavagem com PBS/Tween 0,005%, adicionou-se 100 µl do substrato TMB por poço e incubou-se a placa durante 10 min à temperatura ambiente em local escuro. A reação foi terminada com a adição de 100 µl por poço da solução de paragem e a leitura efetuada em espectrofotómetro a comprimento de onda 450 nm.

CAPÍTULO III

Resultados

3.1. Construção do vetor de expressão da proteína da cápside (pAG426GAL-VP1)

A construção do vetor de expressão pAG426GAL-VP1 foi feita utilizando o sistema de clonagem direcional da Gateway. Este é um sistema que usa a recombinação entre duas sequências (sequências att adaptadas do fago lambda) para inserir um gene num vetor em vez de usar enzimas de restrição e ligase. Este sistema é composto por duas reações. A primeira reação, a reação BP medeia a inserção de um produto de PCR contendo o gene de interesse flanqueado pelas sequências attB no vetor pDONR222, criando o designado vetor de entrada.

3.1.1. Construção do vetor de entrada (pDONR222-VP1)

Amplificação do gene VP1 (NoV) flanqueado pelos locais de recombinação attB

Os primers desenhados neste trabalho tiveram como objetivo a inserção dos locais de recombinação attB a flanquear o gene VP1 do NoV canino, assim como permitir a inserção da cauda de 6HIS. A cauda de 6HIS foi acrescentada à extremidade terminal C' uma vez que a região terminal N' da VP1 é uma região crítica na formação espontânea da cápside (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2002). Adicionalmente, com este procedimento pretendemos minimizar o risco de perturbação da conformação nativa da proteína. A adição do *tag* de 6HIS permite não apenas a purificação num único passo da proteína VP1 por IMAC (Nilsson *et al.*, 1997), mas também facilitar a quantificação e deteção da proteína recombinante por Western Blot utilizando um dos vários anticorpos comerciais disponíveis para a sequência de HIS.

Os primers desenhados continuam entre 57 a 70 pb e uma elevada percentagem de G e C, tornando difícil a desnaturação das cadeias duplas e por isso a reação de PCR necessitou de ser otimizada. Testaram-se assim diferentes concentrações de magnésio, dNTP's e temperaturas de emparelhamento dos primers e diferentes temperaturas de extensão do DNA (resultados não apresentados). As concentrações elevadas de dNTP's e o não magnésio, afetam a especificidade dos primers, podendo estes formar dímeros de primers ou afetar as temperaturas de desnaturação do DNA (Rea e Fulop, 2006). A utilização de um agente desnaturante, como o glicerol, formamida ou dimetilsulfóxido

(DMSO) aumenta a especificidade da reação facilitando a desnaturação da cadeia dupla do DNA (Rea e Fulop, 2006). A adição de 10% de DMSO revelou-se essencial à amplificação do gene que codifica a proteína VP1 (Figura 4).

A amplificação do gene VP1 apresentou uma massa molecular de 1744 pb (figura 4, poço 4). A amplificação de uma porção da proteína VP1 (275 pb) com primers distintos (figura 4, poço 2) foi utilizada como controlo positivo para a reação de PCR.

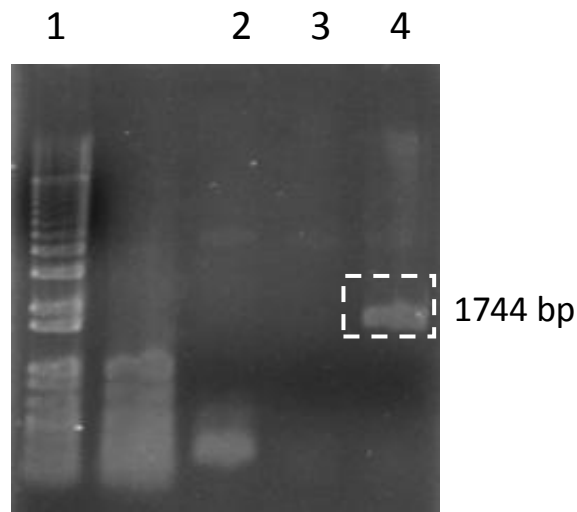


Figura 4. Visualização em gel de agarose 0,8% dos produtos de amplificação do PCR (*gene VP1* flanqueado pelos locais *attB*). (1) Marcador de peso molecular *TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder*, (2) controlo do PCR (amplificação de porção do gene VP1) com o tamanho de 275 pb, (3) Amplificação do gene VP1 na ausência, (4) ou presença de 10% DMSO.

Em cada etapa de caracterização foi necessária uma subclonagem em vetores, que conferiram propriedades funcionais ao segmento clonado. Neste processo, é realizada apenas uma subclonagem, no plasmídeo pDONRTM222. Esta clonagem é baseada na recombinação do fago lambda, uma técnica altamente eficiente e rápida.

A clonagem foi realizada em duas reações: a $attB+attP \rightarrow attL+attR$ mediada pelas enzimas Int e IHF (Figura 5) e a reação $attL+attR \rightarrow attB+attP$ mediada pelas enzimas Int, IHF e Xis. Assim, a direccionalidade das reações é controlada através de diferentes combinações de proteínas e locais de recombinação. A reação BP é uma reação de recombinação entre o produto de PCR flanqueado pelos locais de recombinação *attB* (*attB*₁ e *attB*₂) e o plasmídeo pDONRTM (vetor dador) que contem os locais de recombinação *attP* (*attP*₁ e *attP*₂) (Figura 5) (Invitrogen; Hartley *et al.*, 2000). Na reação

ocorre recombinação de attB₁ com attP₁ mas não com o attP₂, mantendo assim a orientação de leitura durante a recombinação das sequências de DNA.

Os locais de recombinação attB contêm aproximadamente 25 pb e 4 codões de G, no final de 5' do produto de PCR, foram clonados no vetor pDONR por reconhecimento dos locais attP, na presença da enzima clonase BP (Int e IHF), originando clones de entrada constituídos por attL₁-pDONR + produto de PCR-attL₂. Seguidamente, as células de *E. coli* DH5α foram transformadas e inoculadas em meio de LB agar na presença do antibiótico para o crescimento das colónias (seleção em que gene ccdB foi substituído pelo produto de PCR de interesse) (Figura 5).

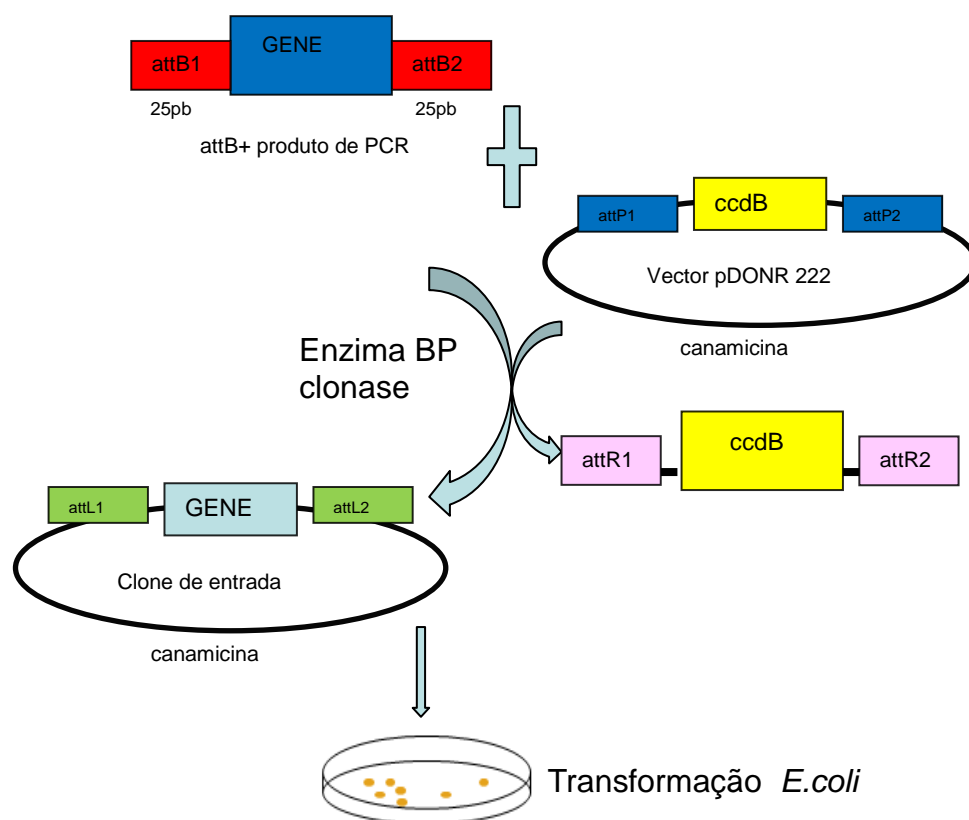


Figura 5. Reação de clonagem BP. O gene VP1 é integrado no vetor pDONR222 criando o designado vetor de entrada. Células de *E. coli* contendo o vetor de entrada são capazes de crescer em meio contendo o antibiótico canamicina enquanto bactérias que incorporaram o vetor pDONR222 não crescem devido à presença do gene ccdB (adaptado do manual da Gateway).

A identificação dos clones recombinantes foi realizada pela análise do padrão de restrição em gel de agarose. Deste modo, o DNA foi digerido com a enzima AflIII (Figura 6).

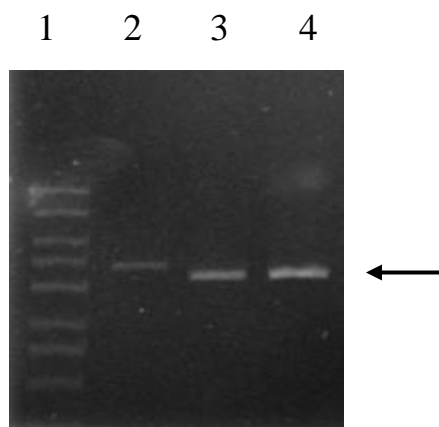


Figura 6. Análise do padrão de restrição do vetor de entrada (pDONR222 + VP1). O DNA plasmídico extraído de dois clones foi digerido com a enzima de restrição AflIII. (1) Marcador de peso molecular; (2) plasmídeo vazio pDONR222 (controlo negativo); (3,4) clones positivos.

O plasmídeo pDONR222 apresenta um tamanho total de 4718 pb, e é cortado duas vezes pela enzima de restrição AflIII. A inserção do gene VP1 neste plasmídeo (com a correspondente saída do gene *ccdB*, de maior tamanho que o gene VP1) leva a que a banda que no vetor vazio corresponde a 4510 pb (Figura 6, poço 2) passe a exibir um menor tamanho correspondendo a 4165 pb (Figura 6, poço 3 e 4). A enzima de restrição AflIII não possui locais de corte no gene VP1 (anexo 1).

3.1.2. Construção do vetor de expressão (pAG426GAL-VP1)

Recombinação entre os sítios attL e attR (reação LR)

A enzima clonase LR do sistema de clonagem da Gateway é constituída pelas enzimas Int (Integrase), IHF (*Integration Host Factor*) e Xis (Excisionase), enzimas que catalisam recombinação *in vitro* entre um vetor de entrada (attL₁-pDONR-VP1-attL₂) e o vetor de destino (attR₁-*ccdB*-attR₂), gerando o vetor de expressão. A recombinação do DNA ocorre nos locais de recombinação attL do vetor de entrada. O vetor de destino utilizado, pAG426GAL faz parte de uma coleção de vetores de levedura com base no plasmídeo pRS, que se encontram preparados (com as sequências attR) para uso pelo método de clonagem da Gateway (Alberti *et al.*, 2007). A reação ocorreu com a ajuda da enzima clonase LR, originando clones preparados para expressar o gene VP1. Seguidamente, as células de *E. coli* DH5α foram transformadas e inoculadas em meio de

LB agar na presença do antibiótico (ampicilina), para o crescimento das colónias (seleção em que gene *ccdB* foi substituído pelo gene VP1) (Figura 7).

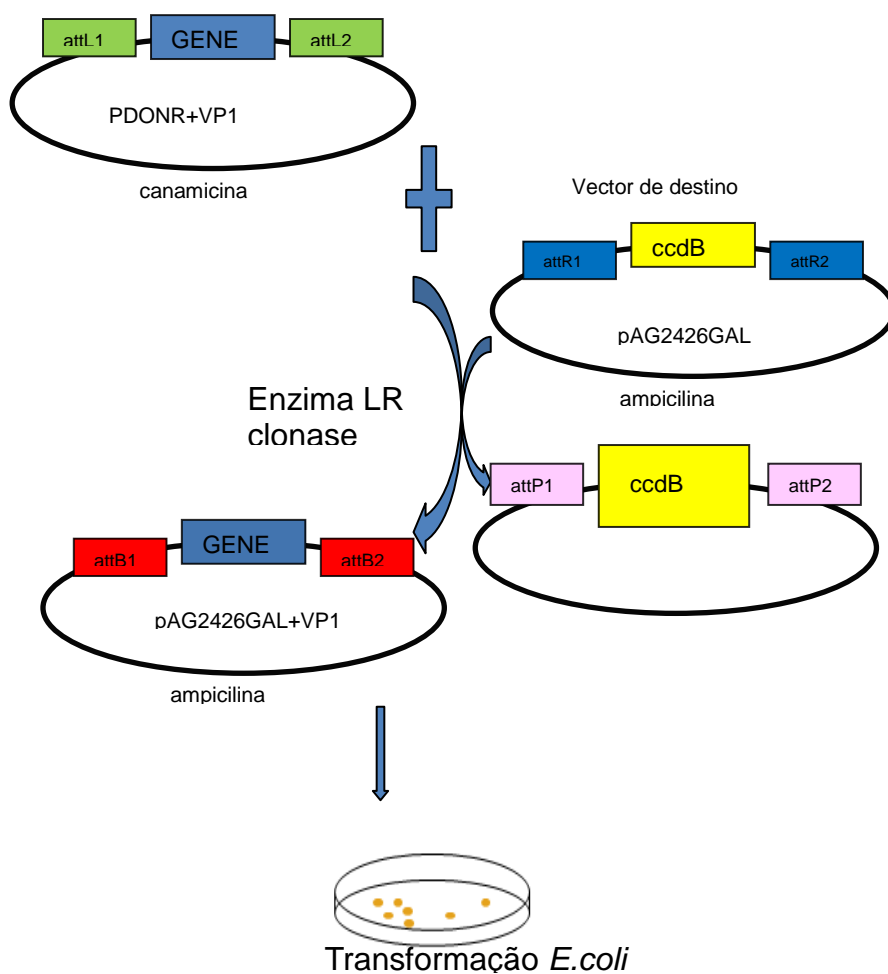


Figura 7. Reação de clonagem LR. Plasmídeo pAG426GAL resistente ao antibiótico ampicilina, permite a inserção do gene VP1 e forma o vetor de expressão (adaptado do manual da Gateway).

O reconhecimento dos clones recombinantes corretos foi feito pela análise dos clones recombinantes em gel de agarose depois da incubação com a enzima de restrição *AccI* (Figura 8).

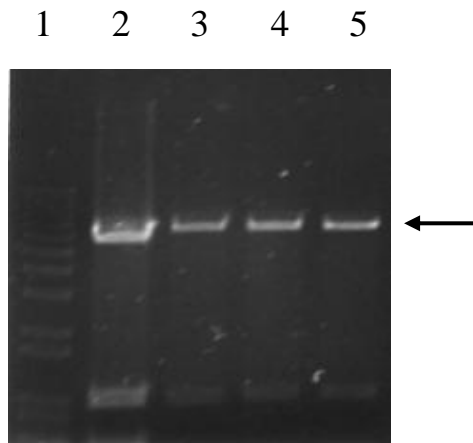


Figura 8. Análise por padrão de restrição dos clones de expressão (426+VP1) em gel de agarose 0,8%. As amostras de DNA foram digeridas com a enzima de restrição AccI. (1) Marcador de massa molecular *TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder*; plasmídeo vazio pAG2426GAL; (3,4,5) amostras de DNA com a inserção do gene VP1.

O plasmídeo pAG2426GAL apresenta um tamanho total de 8126 pb (anexo 2), sendo cortado quatro vezes pela enzima de restrição AccI. A inserção do gene VP1 neste plasmídeo leva a que a banda, que no vetor vazio corresponde a 6590 pb (Figura 8, poço 2), passe a exibir um menor tamanho correspondendo a 6245 pb (Figura 8, poço 3 4 e 5). A enzima de restrição AccI não possui locais de corte no gene VP1 (anexo 2).

3.2. Análise da expressão da proteína da cápside (VP1) na levedura e otimização das condições de crescimento

3.2.1. Expressão da proteína VP1 na levedura

A análise da expressão da proteína VP1 foi realizada em extratos proteicos obtidos a partir das células transformadas (pAG426GAL e pAG426GAL-VP1) utilizando o *tag* de 6HIS reconhecido pelo anticorpo anti-HIS pela técnica de Western Blot. Verificamos a expressão proteína VP1 nas diferentes estirpes de *S. cerevisiae* (W303 1A, By4341 e CG379) testadas para identificar a melhor estirpe produtora. Como controlo da quantidade proteica carregada no gel recorreu-se à deteção da proteína Pgc1p (Figura 9).

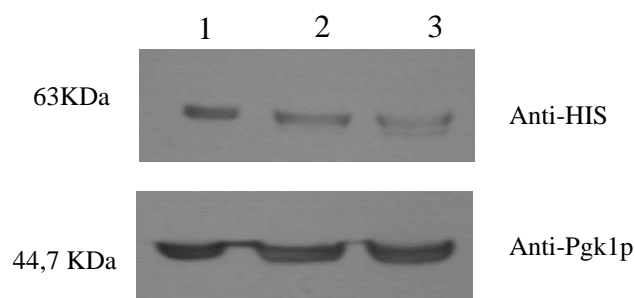


Figura 9. Expressão da proteína VP1 (fundida no terminal C' um tag de 6HIS). Confirmação por Western Blot, para três estirpes diferentes da levedura *S. cerevisiae*: (1) W303 1A, (2) By4743, (3) CG379; a proteína Pgk1p foi utilizada como controlo da quantidade proteica carregada no gel.

A partir destes resultados, pudemos confirmar que a expressão da proteína VP1 na levedura, continha uma massa molecular de aproximadamente de 63 kDa. Como esperado, a proteína Pgk1p utilizada como controlo da quantidade proteica carregada no gel, apresentou a massa molecular de 44,7 kDa.

A quantificação da proteína em comparação com a Pgk1p permitiu-nos concluir que a estirpe W303 1A seria aquela que expressava uma maior quantidade de proteína VP1 (com aproximadamente 59,5%), seguindo-se a estirpe By4341 (com aproximadamente 48,5%) e, por último, a estirpe CG379 (com aproximadamente 34,30%). Com base nestes resultados escolheu-se a estirpe W303 1A como sendo a melhor produtora da proteína recombinante VP1.

3.2.2. Otimização das condições de crescimento

Avaliamos alguns fatores que poderiam interferir com a expressão da proteína recombinante VP1 pela levedura e, deste modo, testámos a expressão proteica a diferentes temperaturas (26°C, 28°C e 30°C), diferentes fases de crescimento (DO_{600} de 2; 1; 0,75; 0,5) e diferentes composições do meio de cultura (0,5% galactose + 1,5% glucose; 2% galactose + 1% rafinose; 2% galactose) (Figura 10). Como controlo da quantidade proteica carregada no gel recorreu-se à análise da expressão da proteína Pgk1p.

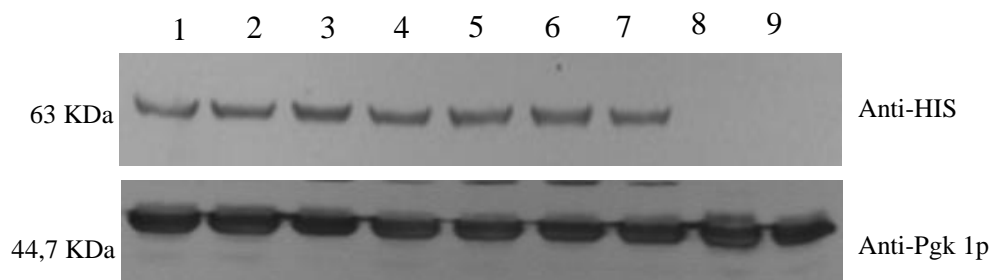


Figura 10. Expressão da proteína VP1 (fundida no terminal C' com o tag 6HIS). Confirmação por Western Blot, para diferentes deOD₆₀₀: (1) 2; (2) 1; (3) 0,75; (4) 0,5 a 30°C; (5) 28°C; (6) 26°C; (7) meio de cultura sem rafinose; (8) meio de cultura composto por 1,5% glucose + 0,5% galactose; (9) vetor vazio (controlo negativo). O vetor vazio foi utilizado como controlo negativo.

A maior expressão da proteína VP1 ocorreu com o crescimento das culturas a 28°C (43,3%), seguindo-se as que cresceram a 30°C (40,8%), apresentando uma menor expressão proteica as culturas que cresceram em meios sem rafinose.

3.3. Purificação da proteína VP1 utilizando colunas de afinidade

3.3.1. Escolha do método de purificação

A técnica utilizada para a purificação da proteína viral foi a IMAC. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE 10% e coradas com azul de Coomassie (Figura 11A). As mesmas amostras foram analisadas por Western Blot usando o anticorpo-anti-HIS (Figura 11B).

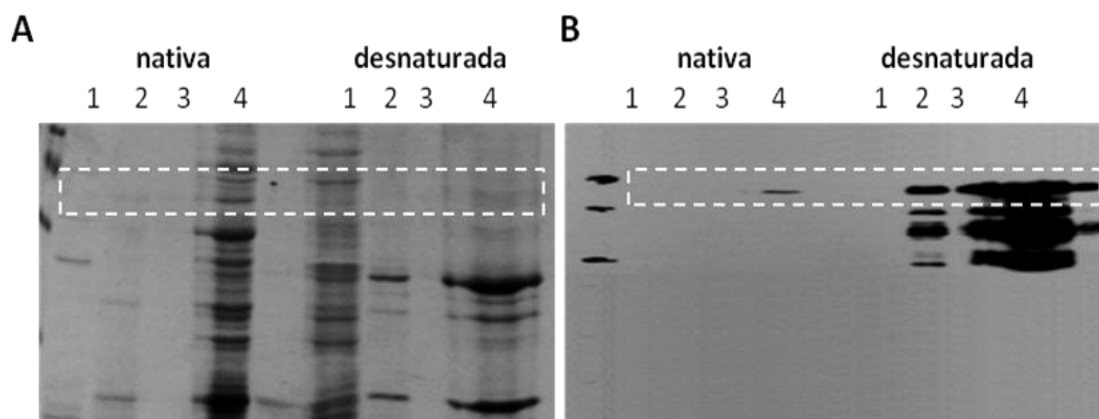


Figura 11. *Otimização das condições de purificação da proteína viral VP1.* A purificação da proteína VP1 foi realizada em condições nativas e em condições desnaturantes (6 M de ureia). A influência do pH da solução de eluição também foi testada. (1) Extrato proteico contendo as proteínas eluídas com 20 mM imidazole; (2) Extrato proteico obtido após eluição com 500 mM de imidazole; (3) Extrato proteico obtido após eluição com 500 mM de imidazole a pH 4,8; (4) Extrato proteico obtido após eluição com 500 mM de imidazole concentrado 10 vezes (precipitação com TCA) (A) Marcação da proteína total em gel de poliacrilamida (corado com azul de Coomassie) e (B) Visualização da proteína VP1 por Western Blot (anticorpo anti-6HIS).

Uma vez que não conseguimos recuperar a proteína em quantidades significativas (apenas visível por Western Blot e quando concentrada por precipitação com TCA), colocamos a hipótese de que na sua estrutura nativa o *tag* de histidina se pode encontrar escondido no interior da proteína VP1 e, desta forma, inacessível para se ligar à coluna e permitir a sua retenção. Para avaliar esta hipótese procedemos à purificação da proteína em condições desnaturantes utilizando como detergente não iónico, a ureia (Figura 11). Verificamos que a purificação em condições desnaturantes aumentou significativamente a ligação da proteína VP1 à coluna (Figura 11, comparar poço 4 nativa e desnaturada). Testámos, ainda, a mínima concentração de ureia (2, 4 e 6 M), para a ligação da proteína à coluna de forma a causar a menor desnaturação possível na proteína, concluindo que a proteína VP1 com as concentrações 2 e 4 M de ureia ainda não se ligava em quantidade suficiente (resultados não apresentados).

Uma vez que na visualização por coloração de Coomassie, a quantidade da proteína total em gel ainda não era significativa fomos verificar se estariam a ocorrer

perdas da proteína VP1 aquando da lavagem com a solução de 20 mM imidazole. O imidazole compete com a ligação das proteínas ricas em histidina ao níquel e baixas concentrações são utilizadas para remover ligações a proteínas endógenas, ligações que serão na sua maioria mais fracas do que a ligação ao *tag* de 6 histidinas, contudo, por vezes também pode levar a perdas na proteína que se pretende purificar. No entanto, verificamos não ser este o caso (Figura 11, poço 1). Por vezes, também podem ocorrer perdas de proteína por uma eluição ineficiente. A força de ligação entre as proteínas e o metal é afetada principalmente pelo ião metálico utilizado e pelo pH do tampão. Assim, experimentamos reduzir o pH do tampão de eluição de 8,0 para 4,8, já que a ligação ótima em proteínas com resíduos de histidina com o ião Ni^{2+} varia entre os 6,0 e 8,0 (Gaberc-Porekar e Menart, 2001) conseguindo-se por vezes melhorar a eluição da proteína recorrendo ao decréscimo do pH. Os resultados demonstraram que a diminuição do pH não melhorou a eluição da proteína VP1 da coluna (Figura 11, comparação dos poços 2 e 3).

Para avaliar a especificidade das bandas obtidas comparamos a estirpe a expressar a proteína VP1 (transformada com o pGAL426-VP1) com a estirpe transformada apenas com o vetor vazio (pGAL426-VP1). Ambas as culturas foram crescidas e procedeu-se à purificação proteica de forma idêntica. Confirmamos a ausência de banda correspondente à VP1 para a levedura controlo. No gel SDS-PAGE, as amostras, depois de purificadas, apresentavam duas bandas muito intensas visíveis no gel de SDS-PAGE com um tamanho inferior ao da proteína de interesse (VP1). Estas bandas também surgem na cultura transformada apenas com o vetor vazio. Concluimos, assim, serem proteínas endógenas com afinidade para o níquel (Figura 12A, comparação dos poços 4 e 5).

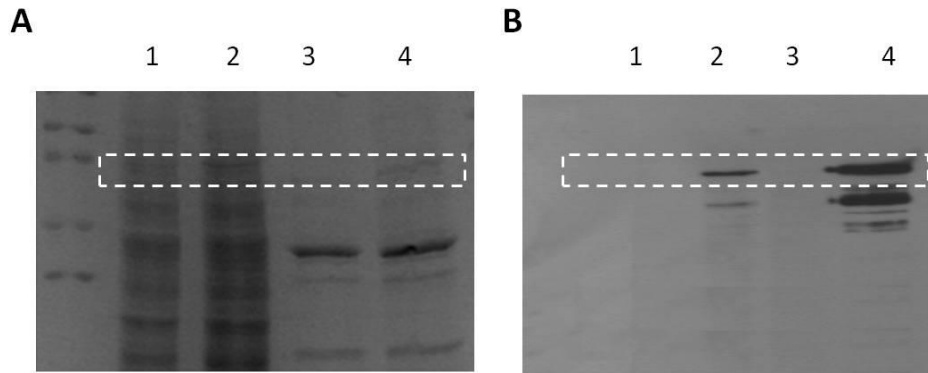


Figura 12. Comparação da cultura que expressa a proteína da cápside VP1 com a cultura que expressa apenas o vetor vazio (controlo negativo). (1) Extracto proteico total para a cultura transformada com o plasmídeo vazio P426GAL; (2) Extracto proteico total para a cultura transformada com o plasmídeo P426GAL-VP1; (3) Extracto proteico purificado para a cultura transformada com o plasmídeo vazio P426GAL; (4) para a cultura transformada com o plasmídeo P426GAL-VP1. (A) Marcação da proteína total em gel de poliacrilamida (corado com azul de Coomassie) e (B) Visualização da proteína VP1 por Western Blot (anticorpo anti-HIS).

Por análise do Western Blot (Figura 12B) verificamos que existem algumas bandas com um peso molecular inferior ao esperado para a VP1 que se tratarão, provavelmente, de produtos de degradação. Os cuidados com a manutenção da cultura arrefecida durante o processo de extração proteica, ou o aumento da concentração de proteases não foram suficientes para resolver o problema.

A eluição da proteína VP1 é realizada por um aumento de gradiente entre 300 mM, 500 mM e 1 M de imidazole. A purificação da proteína da cápside (VP1) aparece numa banda muito ténua (Figura 12A). Desta forma, apesar do processo de purificação se revelar eficiente, o ensaio teve de ser otimizado quanto ao número de células (Figura 12A). A proteína VP1 não é expressa no vetor vazio (Figura 12B). A proteína VP1 é encontrada em maior concentração depois da purificação (Figura 12B, comparação dos poços 2 e 4).

A levedura *S. cerevisiae* possui várias proteases, especialmente a nível vacuolar, sendo uma das principais proteases a proteína *pep4*. Estirpes de *S. cerevisiae* interrompidas no gene *PEP4* são frequentemente utilizadas na produção de proteínas heterólogas uma vez que esta interrupção diminui significativamente a degradação proteica durante a recuperação celular (Marques *et al.*, 2006).

A expressão da proteína VP1 na estirpe *pep4* Δ foi comparada com a expressão da proteína na estirpe selvagem (Figura 13).

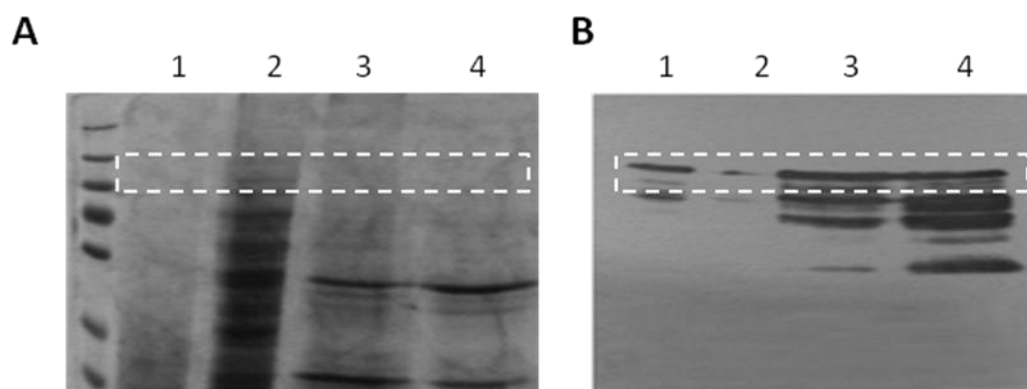


Figura 13. Comparação da expressão da proteína da cápside VP1 na estirpe selvagem e interrompida para o gene *Pep4* (*pep4* Δ). (1) Extracto proteico total para a estirpe selvagem; (2) Extracto proteico total para a estirpe *pep4* Δ ; (3) Extracto proteico purificado para a estirpe selvagem; (4) Extracto proteico total para a estirpe *pep4* Δ . (A) Marcação de proteína total em gel de poliacrilamida (corado com azul de Coomassie) e (B) Visualização da proteína VP1 por Western Blot (anticorpo anti-HIS).

Os resultados demonstram que a degradação da proteína VP1 em ambas as estirpes (selvagem e *pep4* Δ) foi sensivelmente a mesma (Figura 13B). Desta forma, podemos concluir que a remoção do gene *PEP4* também não se revelou eficiente para minorar a degradação da proteína.

3.3.2. Diálise

A desnaturação da proteína VP1 com a adição de ureia levou à perda da conformação nativa. Uma vez que a antigenicidade da proteína poderá ser dependente da sua estrutura tridimensional, procedemos à remoção da ureia através de diálise. Assim, realizamos a separação da proteína de interesse (com uma massa molecular aproximadamente de 63 kDa) da ureia (300 Da), utilizando membranas semipermeáveis, isto é, membranas impermeáveis a moléculas grandes mas permeáveis a iões e moléculas pequenas como água.

A deslocação das moléculas depende do diferencial de concentração entre as duas soluções dos lados opostos da membrana. A máxima eficiência ocorre quando na

membrana os poros estão uniformemente distribuídos e a diferença nas concentrações é grande.

A escolha das membranas de diálise pode variar entre *Cellulose Ester* (CE), *Regenerated Cellulose* (RC) e *Polyvinylidene difluoride* (PVDF). Entre elas varia o material em diálise, o pH, o solvente permitido e o MWCO (*Molecular Weight Cut Off*). Os parâmetros como pH, força iônica ou solventes não aquosos podem causar um desvio no MWCO (Ahmed *et al.*, 1980).

Na escolha da melhor membrana de diálise devemos ter em conta que o mínimo MWCO deve ser 2x maior que o peso molecular das maiores micromoléculas que deverão atravessar a membrana, e que, no mínimo, deverá ser 2x menor do que o menor peso molecular das macromoléculas que deverão ser retidas pela membrana.

As amostras da proteína recombinante VP1 foram dialisadas utilizando membranas de celulose (H1, 18 mm, 50 cm, 5 kDa MWCO, 5 µm) (Roth).

3.4. Implementação do ensaio imunoenzimático (ELISA) com as VP1 produzida em levedura

O ensaio imunoenzimático (ELISA) confirma capacidade da proteína VP1 produzida em levedura formar VLP's. Para isso foram utilizados diferentes soros caninos (32, F2, F27, F42 e F46) que tinham sido previamente avaliados em termos de reatividade para o NoV utilizando VLP's produzidas no sistema de inseto (infecção por baculovirus) (Belliot *et al.*, 2001). A reatividade do ensaio imunoenzimático teve com objetivo a confirmação da antigenicidade das proteínas VP1 produzidas na levedura.

Tabela 4. Especificidade dos soros caninos e proteína VP1 do norovirus obtido em levedura e em inseto (baculovirus).

Sistema de produção da VP1								
Soros	Inseto			Levedura				
	VLP's (VP1 conformação nativa)		Reatividade dos soros	VP1 desnaturada		VP1 conformação nativa		Reatividade dos soros
	Poços revestidos	Poços não revestidos (branco)		Poços revestidos	Poços não revestidos (branco)	Poços revestidos	Poços não revestidos (branco)	
32	0,14	0,0745	-	0,119	0,148	0,113	0,113	-
F2	0,686	0,104	+	0,636	0,199	0,322	0,197	+
F27	0,11	0,072	-	0,177	0,124	0,145	0,123	-
F42	0,337	0,113	+	0,367	0,177	0,262	0,183	+
F46	0,592	0,145	+	0,258	0,144	0,224	0,157	+

Os valores apresentados na tabela 4, correspondem a densidade ótica, ao comprimento de onda de 450 nm, após o ensaio imunoenzimático. Os soros (32, F2, F27, F42 e F46 previamente avaliados em termos de reatividade para o NoV canino) usando VP1 produzida em levedura (condições nativas e desnaturantes) e purificada por IMAC. Como controlo positivo utilizaram-se VLP's produzidas no sistema de inseto (infecção por baculovirus) (Belliot *et al.*, 2001).

Pela análise dos resultados verificamos não existirem diferenças significativas na reação imunoenzimática (ELISA) entre a proteína obtido no sistema de inseto e a proteína obtida no sistema de levedura. O mesmo ocorreu quando se compararam os resultados das proteínas obtidas na levedura em condições desnaturantes ou com conformação nativa. Estes resultados comprovam que a desnaturação da proteína não interfere com a antigenicidade, sendo de ressaltar que com alguns soros os resultados obtidos com a proteína desnaturada foram inclusive melhores. A reatividade dos soros foi determinada quando a absorvências das VLP's revestidas se encontrava acima do limite definido da absorvência do controlo negativo (poços sem VLP's) (Widdowson *et al.*, 2005).

A reatividade antigénica da proteína VP1 produzida em levedura também demonstrou que a introdução de caudas de histidina não altera as propriedades biológicas da proteína.

CAPÍTULO IV

Discussão e perspectivas futuras

O uso crescente de proteínas recombinantes como antigénios em vacinas ou testes de diagnóstico tem-se revelado uma alternativa aos testes e terapias tradicionais. A vacina da hepatite B foi a primeira vacina de sucesso produzida com VLP's recombinantes (Mayhoney, 1999). O uso destas proteínas recombinantes apresenta a grande vantagem de substituírem as preparações tradicionais com agentes patogénicos, uma vez que permitem uma resposta imunológica semelhante a este. Estes novos métodos são extremamente importantes no caso dos vírus, visto que um preparado viral acarreta grandes custos na inativação e atenuação, além dos riscos associados à multiplicação dos vírus infecciosos em culturas de células ou modelos animais (Marx *et al.*, 2001).

A expressão de proteínas virais em levedura tem aumentado nos últimos anos devido às vantagens apresentadas por este sistema, sendo menos dispendioso do que o sistema de expressão em células de mamíferos e insetos (Valenzuela *et al.*, 1982). Além disso, a possibilidade de crescimento em larga escala, a baixa probabilidade de contaminação com toxinas ou vírus infecciosos em comparação com as bactérias e os sistemas de expressão em mamíferos (Franke *et al.*, 1997; Hemmings, 1997) tornam a levedura um sistema promissor.

A descoberta de um novo norovirus canino no norte de Portugal e o potencial risco de transferência zoonótica motivaram a investigação da epidemiologia deste vírus. Uma vez que este é um novo vírus, ainda não existem disponíveis testes comerciais para a sua deteção. Na presente tese pretendeu-se implementar um ensaio imunoenzimático (ELISA) que permitisse avaliar a resposta serológica no humano contra este novo vírus. Para tal foi necessária uma quantidade significativa da proteína viral da cápside (VP1) de modo a serem utilizadas como antigénios. Assim, procedeu-se à clonagem e expressão da proteína VP1 do norovirus canino no sistema de levedura *S. cerevisiae* e implementou-se um método de purificação baseado na fusão de um *tag* de histidinas com a proteína de interesse. Os principais passos seguidos para a produção e purificação da proteína VP1-6HIS neste trabalho encontram-se representados esquematicamente na Figura 14.

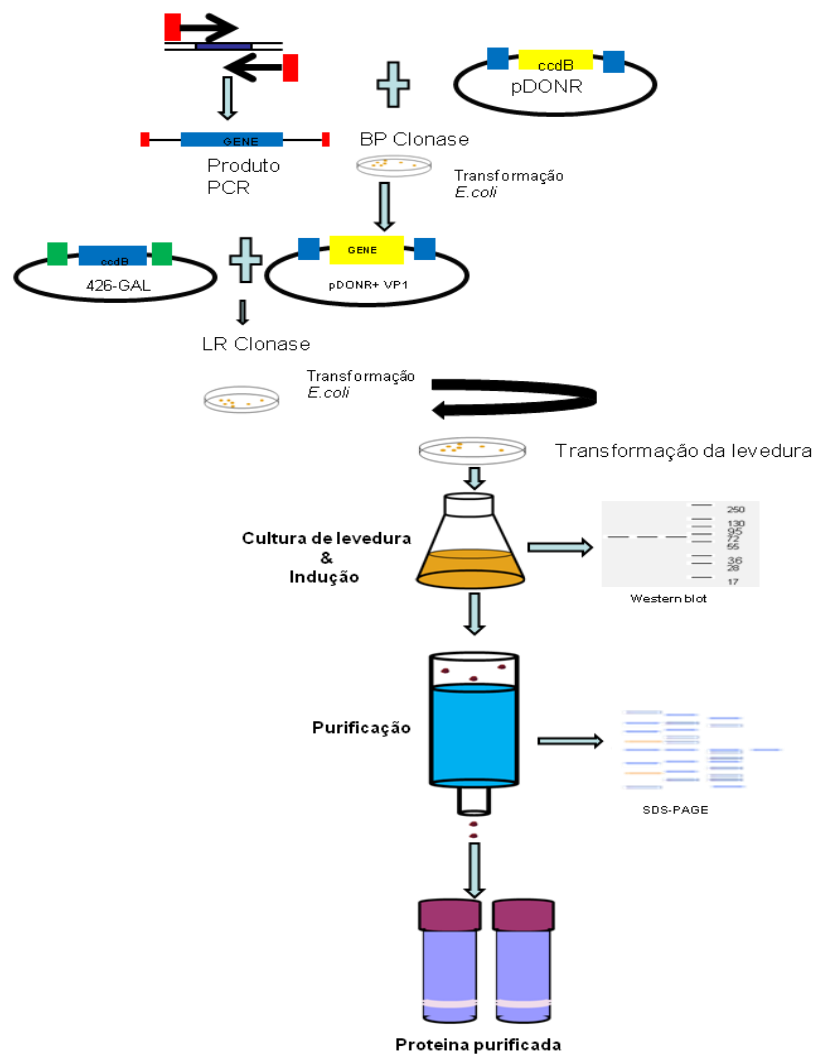


Figura 14. Imagem ilustrativa dos principais passos do processo de produção da proteína recombinante (VP1) a partir de células de levedura. O primeiro passo foi a clonagem da proteína de interesse fundida com uma cauda de 6 histidinas num vetor de expressão de levedura (contendo o promotor *GAL*). Seguidamente a levedura foi transformada e os clones positivos foram identificados por crescimento em meio selectivo. Os clones seleccionados foram cultivados e a expressão da proteína VP1 foi induzida por adição de galactose ao meio de cultura. A expressão da proteína recombinante na levedura foi confirmada por análise de Western Blot utilizando um anticorpo para o *tag* de histidinas. As proteínas totais foram extraídas e a proteína VP1 foi purificada usando colunas em condições desnaturantes (ureia), usando cromatografia de afinidade (para o *tag* de histidinas). Quando necessário, procedeu-se à remoção do agente desnaturante por diálise. O processo foi concluído após a determinação do grau de pureza da proteína por SDS-PAGE e coloração com azul de Coomassie.

A purificação das VLP's pode ser feita por vários métodos (Loberg *et al.*, 2002; Slee *et al.*, 1999), sendo a ultracentrifugação do extrato proteico em gradiente de sacarose o mais utilizado. Esta purificação tradicional é, no entanto, muito demorada, necessitando de uma elevada quantidade de amostra e apenas permitindo a recuperação de uma quantidade pequena de proteína. Assim, o uso da cromatografia de afinidade tem adquirido uma importância crescente devido a permitir um maior rendimento e não interferir nas propriedades da proteína recombinante (Zolotukhin *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2000). A inserção de *tags*, como o de histidina, pode auxiliar com sucesso a produção das proteínas recombinantes e foi demonstrado que não interferem na conformação das VLP's recombinantes (Wigdorovitz *et al.*, 1999). Por exemplo, no estudo da expressão da proteína VP2 de baculovirus B19 foi inserida a proteína de fusão fluorescente (GFP) no terminal N' (Gilbert *et al.*, 2004) ou *tags* de polihistidina nas proteínas VP2 e VP1 da B19 (Michel, 2008), verificando-se que estes não afetavam a conformação das VLP's recombinantes (Cheng *et al.*, 2001). Assim, de modo a obtermos um melhor rendimento na purificação proteica inserimos um *tag* de 6HIS no terminal C' do gene que codifica a proteína da cápside (VP1) do NoV canino e utilizamos o método da cromatografia de afinidade.

As proteínas com *tags* de HIS, contêm uma elevada afinidade para o ião Ni^{2+} , mas pode ser utilizada uma elevada variedade de iões, como o Co^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} e Fe^{3+} , e assim diminuir as ligações de outras proteínas celulares. Tal como descrito, verificamos que a inclusão do reagente imidazole nas amostras e nos tampões, em baixas concentrações, minimiza as ligações inespecíficas de proteínas da célula hospedeira, aumentando o grau de pureza do produto final. No entanto, em concentrações elevadas compete com o *tag* de 6HIS da proteína podendo diminuir o rendimento da proteína. A concentração ideal de imidazole na solução de lavagem varia assim com as propriedades da proteína. Neste trabalho utilizámos uma concentração de 20 mM para a lavagem. Neste trabalho demonstramos que a purificação da proteína da cápside (VP1) pela ligação do *tag* de 6HIS foi eficiente e rápida, evitando demoradas etapas de centrifugação

Adicionalmente, neste trabalho, a purificação da proteína VP1 com o *tag* de histidina foi feita em condições desnaturantes com a concentração de ureia de 6 M. Verificamos, assim, que a inclusão de ureia nos extratos proteicos e nos tampões de eluição, melhoravam a solubilização das proteínas e a especificidade de ligação ao ião Ni^{2+} . Nos testes de ELISA verificamos ainda que esta não afetava a atividade antigénica da proteína VP1 e que os *tags* de HIS não interferiam com a formação da cápside

proteica, não se verificando alterações nas propriedades antigénicas comparativamente com as VLP's produzidas no sistema de inseto.

Neste trabalho demonstramos que com sistema da levedura é possível obter um rendimento proteico elevado e a um custo reduzido quando comparado com outros sistemas de expressão da proteína viral VP1. O rendimento de purificação por cromatografia de afinidade da proteína da cápside VP1, neste estudo, foi de 1,38 mg/g de peso húmido de levedura. O rendimento de purificação de proteínas de algumas estirpes de norovirus tem sido, até agora, baixo (Han *et al.*, 2005). Por exemplo, o estudo realizado por Belliot e colaboradores, descrevendo a produção de VLP's recombinantes em baculovirus, apresentaram um rendimento de 0,4 mg a partir de 500 ml de meio de cultura (Belliot *et al.*, 2001).

O teste de imunoenzimático (ELISA) realizado neste estudo com a proteína VP1 expressa no sistema da levedura *S. cerevisiae* mostrou uma reactividade antigénica semelhante a observada com as VLP's produzidas em inseto. Adicionalmente, neste ensaio observamos que a proteína da cápside (VP1) em condições desnaturantes demonstrou uma reatividade antigénica semelhante à das VLP's em condições nativas. De facto, já outros estudos utilizando proteínas da cápside viral desnaturadas, reportaram que estas retiveram a atividade antigénica das VLP's (Fleury *et al.*, 1999; Widdowson *et al.*, 2005). Isto poderá ser uma vantagem em termos de produção proteica uma vez que permite eliminar o passo da diálise. No entanto, poderá ser útil verificar por microscopia eletrónica se com o nosso sistema a proteína VP1 efetivamente forma VLP's (após a diálise) uma vez que em possíveis aplicações tais como vacinas é importante a manutenção desta estrutura.

CAPÍTULO V

Bibliografía

- Adler, J.L., e Zickl, R., 1969. Winter vomiting disease. *Journal of Infectious Diseases*, 119 (668 – 673).
- Agbandje, M., McKenna, R., Rossmann, M.G., Kajigaya, S., Young, N.S., 1991. Preliminary X-ray crystallographic investigation of human parvovirus B19. *Virology*, 184 (170 – 174).
- Alberti, S., Gitler, A.D., Lindquist, S., 2007. A suite of Gateway cloning vectors for high throughput genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 24 (913 – 919).
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. Molecular biology of the cell, 4th Edition. *Garland Science*, 91 (401 – 405).
- Almeida, M.S., Cabral, K.M.S., Medeiros, L.N., Valente, A.P., Almeida, F.C.L., Kurtenbach, E., 2001. cDNA cloning and heterologous expression of functional cysteine-rich antifungal protein Psd1 in the yeast *Pichia pastoris*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 395 (1006).
- Almeida, M.S., Cabral, K.M.S., Zingali, R.B., Kurtenbach, E., 2000. Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 378 (278 - 286).
- Ahmed, S.M., El-Asser, M.S., Pauli, G.H., Poehlein, G.W., Vanderhoff, J.W., 1980. Cleaning latexes for Surface Characterization by Serum Replacement. *Journal of Colloid and Interface Science*, 73 (338 – 406).
- Anderson, R., Macdonald, I., Corbett, T., Whiteway, A., Prentice, H.G., 2000. A method for the preparation of highly purified adeno associated virus using affinity column chromatography, protease digestion and solvent extraction. *Journal of Virological Methods*, 85 (23 – 34).
- Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G.E., Pedersen, J., 2006. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*, 48 (1 – 13).
- Arnold, F.H., 1991. Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing. *National Center for Biotechnology Information*, 9 (151 – 156).
- Asenjo, J.A., e Andrews, B.A., 2004. Is there a rational method to purify proteins? From expert systems to proteomics. *Journal of Molecular Recognition*, 17 (236 – 247).
- Atmar, R. L., e Estes, E. M. K., 2001. Diagnosis of no cultivatable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (15 – 37).

- Ausar, S.F., Foubert, T.R., Hudson, M.H., Vedvick, T.S., Middaugh, C.R., 2006. Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles. Effect of pH and temperature. *Journal of Biological Chemistry*, 2811 (9478 – 19488).
- Bae, J.H., Sohn, J.H., Rhee, S., Choi, E., 2005. Cloning and characterization of the *Hansenula polymorpha* PEP4 gene encoding proteinase A. *Yeast*, 22 (13 – 19).
- Ball, J.M., Hardy, M.E., Atmar, R.L., Conner, M.E., Estes, M.K., 1998. Oral immunization with recombinant Norwalk virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *Journal of Virology*, 72 (1345 – 1353).
- Baneyx, F., e Mujacic, M., 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 22 (1399 – 1408).
- Belliot, G., Sosnovtsev, S.V., Mitra, T., Hammer, C., Garfield, M., Green, K. Y., 2003. In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus infected cells. *Journal of Virology*, 77 (10957 – 10974).
- Belliot, G., Noel, J.S., Li, J. Seto, Y., Humphrey, C.D., Ando, T., Glass, R.I., Monroe, S.S., 2001. Characterization of Capsid Genes, Expressed in the Baculovirus System, of Three New Genetically Distinct Strains of “Norwalk-Like Viruses”. *Journal of Clinical Microbiology*, 12 (4288 – 4295).
- Bertolotti-Ciarlet, A., Crawford, S.E., Hutson, A.M., Estes, M.K., 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. *Journal of Virology*, 77 (11603 – 11615).
- Bertolotti-Ciarlet, A., White, L.J., Chen, R., Prasad, B.V., Estes, M.K., 2002. Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *Journal of Virology*, 76 (4044 – 4055).
- Bundy, B.C., e Swartz, J.R., 2011. Efficient disulfide bond formation in virus-like particles. *Journal of Biotechnology*, 10 (1016).
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (248 – 254).
- Bragard, C., Duncan, G.H., Wesley, S.V., Naidu, R.A., Hammer, T., 2000. Virus-like particles assemble in plants and bacteria expressing the coat protein gene of *Indian peanut clump virus*. *Journal of General Virology*, 81 (267 – 272).

- Brown, T.A., 2006. Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction. *Blackwell's*, (132 – 157).
- Brown, C.S., Van Lent, J.W., Vlak, J.M., Spaan, W.J., 1991. Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins. *Journal of Virology*, 65 (2702 – 2706).
- Bucher, M.H., Evdokimov, A.G., Waugh, D.S., 2002. Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin binding protein. *Biology Crystallographica*, 58 (392 – 397).
- Cadel, S., Gouzy-Darmon, C., Petres, S., Piesse, C., Pham, V.L., Beinfeld, M.C., Cohen, P., Foulon, T., 2004. Expression and purification of rat recombinant aminopeptidase B secreted from baculovirus infected insect cell. *Protein Expression and Purification*, 36 (19 – 30).
- Cass, B., Pham, P.L., Kamen, A., Durocher, Y., 2005. Purification of recombinant proteins from mammalian cell culture using a generic double affinity chromatography scheme. *Protein Expression and Purification*, 40 (77 – 85).
- Chant, A., Kraemer-Pecore, C.M., Watkin, R., Kneale, G.G., 2005. Attachment of a histidine tag to the minimal zinc Wnger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site. *Protein Expression and Purification*, 39 (152 – 159).
- Chatterjee, D.K., e Esposito, D., 2005. Enhanced soluble protein expression using two new fusion tags. *Protein Expression and Purification*, 10 (1016).
- Chen, H., Xu, Z., Xu, N., Cen, P., 2005. Efficient production of a soluble fusion protein containing human beta-defensin-2 in *E. coli* cell-free system. *Journal of Biotechnology*, 115 (307 – 315).
- Cheng, Y.S., Lee, M.S., Lai, S.Y., Doong, S.R., Wang, M.Y., 2001. Separation of pure and immunoreactive virus-like particles using gel filtration chromatography following immobilized metal ion affinity chromatography. *Biotechnology Progress*, 17 (318 – 325).
- Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W., Wingfield, P.T., 1997. Current Protocols in Protein Science. *John Wiley and Sons*, 1 (1 - 10).
- Coligan, J.E., Dunn, B.M., Pleogh, H.L., Speicher, D.W., Wingfield, P.T., 1995. Current Protocol of Protein Science. *John Wiley and Sons*, 35 (213).

- Cook, J.C., Joyce, J.G., George, H.A., Schultz, L.D., Hurni, W.M., Keller, P.M., Lehman, E.D., 1999. Purification of virus-like particles of recombinant human papillomavirus type 11 major capsid protein L1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expression and Purification*, 17 (477 – 484).
- Costa, M.J.L., Pedro, L., Alves de Matos, A.P., Aires-Barros, M.R., Belo, J.A., Gonçalves, J., Ferreira, G.N.M., 2007. Molecular construction of Bionanoparticles Chimeric Simian Immunodeficiency – Human Immunodeficiency nanoparticles with minimal viral protein content. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 48 (35 – 43).
- Daly, R., Hearn, e M.T.W., 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 18 (119 – 138).
- David, M.O., e Szucs, G., 2003. Calicivirus infections in children. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 16 (241 – 246).
- De Palma, A.M., Vliegen, I., De Clercq, E., Neyts, J., 2008. Selective inhibitors of picornavirus replication. *Medical Care Research and Review*, 28 (823 – 884).
- Deng, Y., Batten, C.A., Liu, B.L., Lambden, P.R., Elschner, M., Gunther, H., Otto, P., Schnurch, P., Eichhorn, W., Herbst, W., Clarke, I.N., 2003. Studies of epidemiology and seroprevalence of bovine noroviruses in Germany. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (2300 – 2305).
- Demain, A.L., e Vaishnav, P., 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27 (297 – 306).
- Deml, L., Speth, C.M., Dierich, P., Wolf, H., Wagner, R., 2005. Recombinant HIV-1 Pr55gag virus-like particles: potent stimulators of innate and acquired immune responses. *Molecular Immunology*, 42 (259 – 277).
- Derewenda, Z.S., 2004. The use of recombinant methods and molecular engineering in protein crystallization. *Methods*, 34 (354 – 363).
- Duizer, E., Bijkerk, P., Rockx, B., De Groot, A., Twisk, F., Koopmans, M., 2004. Inactivation of caliciviruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (4538 – 4543).
- Ettayebi, K., e Hardy, M.E., 2003. Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *Journal of Virology*, 77 (11790 – 11797).

- Estes, M.K., Prasad, B.V., Atmar, R.L., 2006. Noroviruses everywhere: has something changed? *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19 (467 – 474).
- Farkas, T., Sestak, K., Wei, C., Jiang, X., 2008. Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *Journal of Virology*, 82 (5408 – 5416).
- Farkas, T., Nakajima, S., Sugieda, M., Deng, X., Zhong, W., Jiang, X., 2005. Seroprevalence of Noroviruses in Swine. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (657 – 661).
- Fleury, M.J.J., Touzé, A., Alvarez, E., Carpentier, G., Clavel, C., Vautherot, J.F., Coursaget, P., 1999. Identification of type-specific and cross-reactive neutralizing conformational epitopes on the major capsid protein of human papillomavirus type 31. *Archives of Virology*, 151 (1511 – 1523).
- Fonda, I., Kenig, M., Gaberc-Porekar, V., Pristovaek, P., Menart, V., 2002. Attachment of histidine tags to recombinant tumor necrosis factor alpha drastically changes its properties. *Science World Journal*, 15 (1312 – 1325).
- Fouquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., e Ball, L.A., 2007. Virus taxonomy. *Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, (447 – 496).
- Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C., 1997. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*, 88 (435 – 437).
- Gaberc-Porekar, V., e Menart, V., 2001. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49 (335).
- Gelperin, D.M., White, M.A., Wilkinson, M.L., Kon, Y., Kung, L.A., Wise, K.J., Lopez-Hoyo, N., Jiang, L., Piccirillo, S., Yu, H., Gerstein, M., Dumont, M.E., Phizicky, E.M., Snyder, M., Grayhack, E.J., 2005. Biochemical and genetic analysis of the yeast proteome with a movable ORF collection. *Genes and Development*, 19 (2816 – 2826).
- Gellison, G., Janowicz, Z.A., Weydemann, U., Melber, K., Strasser, A.W.M., Hollenberg, C.P., 1992. High-level expression of foreign genes in *Hansenula polymorpha*. *Biotechnology Advances*, 10 (179 – 189).
- Ghabrial, S.A., 1980. Effects of fungal viruses on their hosts. *Annual Review of Phytopathology*, 18 (441 – 461).

- Gilbert, L., Toivola, J., Lehtomaki, E., Donaldson, L., Kapyla, P., Vuento, M., Oker-Blom, C., 2004. Assembly of fluorescent chimeric virus-like particles of canine parvovirus in insect cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313 (878 – 887).
- Glass, R.I., Parashar, U.D., Estes, M.K., 2009. Norovirus gastroenteritis. *New England Journal of Medicine*, 29; 361 (1776 – 1785).
- Glass, P.J., Zeng, C.Q., Estes, M.K., 2003. Two Nonoverlapping Domains on the Norwalk Virus Open Reading Frame 3 (ORF3) Protein Are Involved in the Formation of the Phosphorylated 35K Protein and in ORF3-Capsid Protein Interactions. *Journal of Virology*, 77 (3569 – 3577).
- Glass, P.J., White, L.J., Ball, L.M., Leparco-Coffart, I., Hardy, M.E., Estes, M.K., 2000. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *Journal of Virology*, 74 (6581 – 6591).
- Goel, A., Colcher, D., Koo, J.S., Booth, B.J., Pavlinkova, G., Batra, S.K., 2000. Relative position of the hexahistidine tag affects binding properties of a tumor-associated single-chain Fv construct. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1523 (13 – 20).
- Graham, D.Y., Jiang, X., Tanaka, T., Opekun, A.R., Madore, H.P., e Estes, M.K., 1994. Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. *Journal of Infectious Diseases*, 170 (34 – 43).
- Graslund, S., Eklund, M., Falk, R., Uhlen, M., Nygren, P.A., Stahl, S., 2002. A novel affinity gene fusion system allowing protein A-based recovery of non-immunoglobulin gene products. *Journal of Biotechnology*, 99 (41 – 50).
- Green, K.Y., 2007. Caliciviridae: The Noroviruses. In: Knipe, D.M.H., Peter, M.. *Fields Virology, 5ed., Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins*, 1 (949 – 979).
- Green, K.Y., Chanock, R.M., Kapikan, A.Z., 2001. Human caliciviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., editors. *Fields virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins*, 1 (841 – 874).
- Green, K.Y., Ando, T., Balayan, M.S., Berke, T., Clarke, I.N., Estes, M.K., Matson, D.O., Nakata, S., Neill, J.D., Studdert, M.J., Thiel, H.J., 2000. Taxonomy of the caliciviruses. *Journal of Infectious Diseases*, 181 (322 – 330).
- Green, K.Y., Kapikian, A.Z., Valdesuso, J., Sosnovtsev, S., Treanor, J.J., Le, J.F., 1997. Expression and self-assembly of recombinant capsid protein from the antigenically

- distinct Hawaii human calicivirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (1909 – 1914).
- Green, K.Y., Lew, J.F., Jiang, X., Kapikian, A.Z., Estes, M.K., 1993. Comparison of the reactivities of baculovirus-expressed recombinant Norwalk virus capsid antigen with those of the native Norwalk virus antigen in serologic assays and some epidemiologic observations. *Journal of Clinical Microbiology*, 31 (2185 – 2191).
- Guerrero, R., Ball, J., Estes, M., 1998. Immunogenicity in mice of recombinant Norwalk virus-like particles administered by mucosal routes. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 26 (547).
- Guerrero, R.A., Ball, J.M., Krater, S.S., Pacheco, S.E., Clements, J.D., Estes, M.K., 2001. Recombinant Norwalk virus-like particles administered intranasally to mice induce systemic and mucosal (fecal and vaginal) immune responses. *Journal of Virology*, 75 (9713 – 9722).
- Guo, M., Evermann, J.F., Saif, L.J., 2001. Detection and molecular characterization of cultivable caliciviruses from clinically normal mink and enteric caliciviruses associated with diarrhea in mink. *Archives of Virology*, 146 (479–493).
- Hage, D.S., 1999. Affinity chromatography: a review of clinical applications. *Clinical Chemistry*, 45 (593 – 615).
- Hale, A.D., Crawford, S.E., Ciarlet, M., Green, J., Gallimore, C., Brown, D.W., Jiang, X., Estes, M.K., 1999. Expression and self-assembly of Grimsby virus: antigenic distinction from Norwalk and Mexico viruses. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6 (142 – 145).
- Han, M.G., Smiley, J.R., Thomas, C., Saif, L.J., 2005. Self-Assembly of the Recombinant Capsid Protein of a Bovine Norovirus (BoNV) into Virus-Like Particles and Evaluation of Cross-Reactivity of BoNV with Human Noroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (778 – 785).
- Hansman, G.S., Takeda, N., Katayama, K., Tu, E.T., McIver, C.J., Rawlinson, W.D., White, P.A., 2006. Genetic diversity of Sapovirus in children. *Emerging Infectious Diseases journal*, 12 (141 – 143)
- Hardy, M.E., 2005. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiology Letters* 253 (1 – 8).
- Hartley, J.L., Temple, G.F., Brasch, M.A., 2000. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research*, 10 (1788 – 1795).

- Hemmings, B.A., 1997. Akt Signaling Linking Membrane Events to Life and Death Decisions. *Science*, 275 (628 – 630).
- Huhti, L., Blazevic, V., Numinen, K., Koho, T., Hytonem, V.P., Vesikari, T., 2010. A comparison of methods for purification and concentration of norovirus GII-4 capsid virus-like particles. *Archives of Virology*, 155 (1855 – 1858).
- Humphries, H.E., Christodoulides, M., Heckels, J.E., 2002. Expression of the class 1 outer-membrane protein of *Neisseria meningitidis* in *Escherichia coli* and purification using a self-cleavable affinity tag. *Protein Expression and Purification*, 26 (243 – 248).
- Hunt, I., 2005. From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression. *Protein Expression and Purification*, 40 (1 – 22).
- Hutson, A.M., Atmar, R.L., Estes, M.K., 2004. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol*, 12 (279 – 287).
- Hutson, A. M., Atmar, R.L., Marcus, D.M., e Estes, M. K., 2003. Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to H histo-blood group antigens. *Journal of Virology*, 77 (405 – 415).
- Ike, A.C., Brockmann, S.O., Hartelt, K., Marschang, R.E., Contzen, M., Oehme, R.M., 2006. Molecular epidemiology of norovirus in outbreaks of gastroenteritis in southwest Germany from 2001 to 2004. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (1262-1267).
- Inglis, P.W., e Valadares-Inglis, M.C., 1997. Rapid isolation of double-stranded RNAs from entomopathogenic species of the fungus *Paecilomyces* using a commercial minicolumn system. *Journal of Virological Methods*, 67 (113-116).
- Invitrogen - Hartley, J.L., Temple, G.F., e Brasch, M.A., 2000. DNA Cloning Using In Vitro Site-Specific Recombination. *Genome Research*, 10 (1788 – 1795).
- Jackwood, D.J., Spalding, B.D., Sommer, S.E., 2003. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction detection and analysis of nucleotide sequences coding for a neutralizing epitope on infectious bursal disease viruses. *Avian Diseases*, 47 (738 – 744).
- Jacksona, J.C., Phelanb, D., Morrisonc, A.P., Redfern, R.M., Mathewson, A., 2002. Characterization of Geiger Mode Avalanche Photodiodes for Fluorescence Decay Measurements. *Proceedings of SPIE*, (4650 – 4607).

- Jiang, X., Matson, D.O., Ruiz-Palacios, G.M., Hu, J., Treanor, J., Pickering, L.K., 1995. Expression, self-assembly, and antigenicity of a Snow Mountain agent like *calicivirus* capsid protein. *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (1452 – 1455).
- Jiang, X., Wang, M., Graham, D.Y., Estes, M.K., 1992. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *Journal of Virology*, 66 (6527 – 6532).
- Kajigaya, S., Fujii, H., Field, A., Anderson, S., Rosenfeld, S., Anderson, L.J., Shimada, T., Young, N.S., 1991. Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88 (4646 – 4650).
- Kapikian, A.Z., 2000. The discovery of the 27 nm Norwalk virus: an historic perspective. *Journal of Infectious Diseases*, 181 (295 – 302).
- 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. *Journal of Virology*, 10 (1075 – 1081).
- Karger, A., Bettin, B., Granzow, H., Mettenleiter, T.C., 1998. Simple and rapid purification of alphaherpesviruses by chromatography on a cation exchange membrane. *Journal of Virological Methods*, 70 (219 – 224).
- Karst, S.M., 2010. Pathogenesis of Noroviruses, Emerging RNA Viruses. *Viruses*, 2 (748 – 781).
- Karst, S.M., Wobus, C.E., Lay, M., Davidson, J., Virgin, H.W., 2003. STAT1- Dependent Innate Immunity to a Norwalk-Like Virus. *Science*, 299 (1575 – 1578).
- Kerr, S., O’Keeffe, G., Kilty, C., Doyle, S., 1999. Undenatured parvovirus B19 antigens are essential for the accurate detection of parvovirus B19 IgG. *Journal of Medical Virology*, 57 (179 – 185).
- Khan, R.R., Lawson, A.D., Minnich, L.L., Martin, K., Nasir, A., Emmett, M.K., Welch, C.A., Udall, J.N., 2009. Gastrointestinal Norovirus Infection Associated With Exacerbation of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 48 (328 – 333).
- King, W.G., Mattaliano, M.D., Chan, T.O., Tschlis, P.N., Brugge, J.S., 1997. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Molecular and Cellular Biology*, 17 (4406 – 4418).

- Kim, K.M., Yi, E.C., Baker, D., Zhang, K.Y., 2001. Post-translational modification of the N-terminal His tag interferes with the crystallization of the wild-type and mutant SH3 domains from chicken src tyrosine kinase, *Acta Crystallographica Section D- Biological Crystallography*, 57 (759 – 762).
- Kirnbauer, R., Taub, J., Greenstone, H., Roden, R., Durst, M., Gissmann, L., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 1993. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *Journal of Virology*, 67 (6929 – 6936).
- Kobayashi, S., Sakae, K., Suzuki, Y., Ishiko, H., Kamata, K., Suzuki, K., Natori, K., Miyamura, T., Takeda, N., 2000. Expression of recombinant capsid proteins of chitta virus, a genogroup II Norwalk virus, and development of an ELISA to detect the viral antigen. *Microbiology and Immunology*, 44 (687 – 693).
- Koopmans, M., e Duizer, E., 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology*, 90 (23 – 41).
- Kost, T.A., e Condreay, J.P., 1999. Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 10 (428 – 433).
- Landy, A., 1989. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site specific recombination. *Annual Review of Biochemistry*, 58 (913 – 949).
- Lamesch, P., Li, N., Milstein, S., Fan, C., Hao, T., Szabo, G., Hu, Z., Venkatesan, K., Bethel, G., Maitin, P., Rogers, J., Lawlor, S., McLaren, S., Dricot, A., Borick, H., Cusick, M.E., Vandenhaute, J., Dunham, I., Hill, D.E., Vidal, M., 2007. hORFeome v3.1: a resource of human open reading frames representing over 10,000 human genes. *Genomics*, 89 (307 – 315).
- Lee, J., Babiuk, L.A., Harland, R., Gibbons, E., Elazhary, Y., Yoo, D., 1995. Immunological response to recombinant VP8 subunit protein of bovine rotavirus in pregnant cattle. *Journal of General Virology*, 76 (2477 – 2483).
- Lienqueo, M.E., Leser, E.W., Asenjo, J.A., 1996. An expert system for the selection and synthesis of multistep protein separation processes. *Computers & Chemical Engineering*, 20 (189 – 194).
- Lima, N., e Mota, M., 2003. Biotecnologia- Fundamentos e Aplicações. *Lidel*, (172).
- Lindsmith, L., Moe, C., Marionneau, S., Ruvoen, N., Jiang, X., Lindblad, L., et al., 2003. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nature Medicine*, 9 (548 – 553).
- Liu, D.W., Chang, J.L., Tsao, Y.P., Huang, C.W., Kuo, S.W., Chen, S.L., 2005. Co-Vaccination with Adeno-Associated Virus Vectors Encoding Human

- Papillomavirus 16 L1 Proteins and Adenovirus Encoding Murine GM-CSF can Elicit Strong and Prolonged Neutralizing Antibody. *Int. J. Cancer*, 113 (93 – 100).
- Liu, X.Q., 2000. Protein-splicing intein: genetic mobility, origin, and evolution. *Annual Review of Genetics*, 34 (61 – 76).
- Liu, B.L., Lambden, P.R., Gunther, H., Otto, P., Elschner, M., Clarke, I.N., 1999. Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *Journal of Virology*, 73 (819 – 825).
- Loberg, R.D., Vesely, E., Brosius, F.C., 2002. Enhanced Glycogen Synthase Kinase-3b Activity Mediates Hypoxia-Induced Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells and is Prevented by Glucose Transport and Metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (41667 – 41673).
- Lopman, B.A., Reacher, M., Gallimore, C., Adak, G.K., Gray, J.J. Brown, D.W., 2003. A summertime peak of "winter vomiting disease": surveillance of noroviruses in England and Wales, 1995 to 2002. *BMC Public Health*, 24 (13).
- Nallamsetty, S., e Waugh, D.S., 2005. Solubility-enhancing proteins MBP and NusA play a passive role during the folding of their fusion partners. *Protein Expression and Purification*, 454 (175 – 218).
- Nilsson, J., Stahl, S., Lundeberg, J., Uhlen, M., Nygren, P.A., 1997. Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*, 11 (1 – 16).
- Noad, R., e Roy, P., 2003. Virus-like particles as immunogens. *Trends in Microbiology*, 11 (9).
- Mahoney, F.J., 1999. Update on Diagnosis Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (351 – 366).
- Mandic, A., Vujkov, T., 2004. Human papillomavirus vaccines as a new way of preventing cervical cancer: a dream or the future? *Annals Oncology*, 15 (197 – 200).
- Martella, V., Lorusso, E., Decaro, N., Elia, G., Radogna, A., D'Abramo, M., Desario, C., Cavalli, A., Corrente, M., Cameri, M., Germinarui, C.A., Banyai, K., Di Martino, B., Marsilio, F., Carmichael, L.E., BuonaviGlia, C., 2008. Detection and molecular characterization of a canine norovirus. *Emerging Infectious Diseases*, 14 (1306 – 1308).
- Marques, M., Mojzita, D., Amorim, M.A., Almeida, T., Hohmann, S., Moradas-Ferreira, P., Costa, V., 2006. The Pep4p vacuolar proteinase contributes to the turnover of

- oxidized proteins but PEP4 overexpression is not sufficient to increase chronological lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 152 (3595 – 3605).
- Marx, F., Gritsun, T.S., Grubeck-Loebenstien, B., Gould, E.A., 2001. Diagnostic immunoassays for tick-borne encephalitis virus based on recombinant baculovirus protein expression. *Journal of Virological Methods*, 91 (75 – 84).
- Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y., Horinouchi, S., Yoshida, A.M., 2006. ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature Biotechnology*, 24 (841 – 847).
- Mattison, K., Shukla, D., Cook, A., Pollari, F., Friendship, R., Kelton, D., Bidawid, S., Farber, J.M., 2007. Human noroviruses in swine and cattle. *Emerging Infectious Diseases*, 13 (1184 – 1188).
- Mayer, A., Sharma, S.K., Tolner, B., Minton, N.P., Purdy, D., Amlot, P., Tharakan, G., Begent, R.H.J., Chester, K.A., 2004. Modifying an immunogenic epitope on a therapeutic protein: a step towards an improved system for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *British Journal of Cancer*, 90 (2402 – 2410).
- Mayo, M.A., 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Archives of Virology*, 147 (1655 – 1656).
- Mena, J.A., Ramírez, O.T., Palomares, L.A., 2005. Quantification of rotavirus-like particles by gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography, B*, 824 (267 – 276).
- Meslin, F.X., Stohr, K., Heymann, D., 2000. Public health implications of emerging zoonoses. *Research in Veterinary Science*, 19 (310 – 317).
- Mesquita, J.R., Barclay, L., Nascimento, M.S., Vinjé, J., 2010. Novel Norovirus in Dogs with Diarrhea. *Emerging Infectious Diseases*, 10 (3201).
- Meyers, G., Wirblich, C., e Thiel, H.J., 1991. Rabbit hemorrhagic disease virus. Molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology*, 184 (664 – 676).
- Michaelson, D., e Philips, M., 2006. The use of GFP to localize Rho GTPases in living cells. *Cell Biology and Pharmacology*, 406 (296 – 315).
- Michel, P.O., Makela, A.R., Korhonen, E., Toivola, J., Hedman, L., Soderlund-Venermo, M., Hedman, K., Oker-Blom, C., 2008. Purification and analysis of polyhistidine-

- tagged human parvovirus B19 VP1 and VP2 expressed in insect cells. *Journal of Virological Methods*, 152 (1 – 5).
- Muller, B., Klemm, U., Mas Marques, A., Schreier, E., 2007. Genetic diversity and recombination of murine noroviruses in immunocompromised mice. *Archives of Virology*, 152 (1709 – 1719).
- Oliver, S.L., Batten, C.A., Deng, Y., Elschner, M., Otto, P., Charpilienne, A., Clarke, I.N., Bridger, J.C., Lambden, P.R., 2006. Genotype 1 and Genotype 2 Bovine Noroviruses Are Antigenically Distinct but Share a Cross-Reactive Epitope with Human Noroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (992 – 998).
- Oliver, S.L., Dastjerdi, A.M., Wong, S., El-Attar, L., Gallimore, C., Brown, D.W., Green, J., Bridger, J.C., 2003. Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk- like viruses) unlikely to be of risk to humans. *The Journal of Virology*, 77 (2789 – 2798).
- Patel, M.M., Halla, A.J., Vinjé, J., Parashara, U.D., 2009. Noroviruses: A comprehensive review. *Journal of Clinical Virology*, 44 (1 – 8).
- Patrick, M.A., Kim, H.J., Kim, H.J., 2008. Optimum conditions for production and purification of human papillomavirus type 16 L1 proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expression and Purification*, 59 (175 – 181).
- Paul, R., Bosch, F.U., Schafer, K.P., 2001. Over expression and purification of Helicobacter pylori Xavodoxin and induction of a specific antiserum in rabbits, *Protein Expression and Purification*, 22 (399 – 405).
- Park, Y., Cho, Y.H., Jee, Y., Ko, G., 2008. Immunomagnetic separation combined with real-time reverse transcriptase PCR assays for detection of norovirus in contaminated food. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (4226 – 4230).
- Parrish, J.R., Limjindaporn, T., Hines, J.A., Liu, J. Lui, G., Finley, R.L.J.R., 2004. High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORFs by in vivo recombination in *Escherichia coli*. *Journal of Proteome Research*, 3 (582 – 586).
- Peixoto, C., Sousa, M.F.Q., Silva, A.C., Carrondo, M.J.T., Alves, P.M., 2007. Downstream Processing of Triple-layered Rotavirus Like Particles. *Journal of Biotechnology*, 127 (452 – 461).
- Peng, J., Liang, S., Liang, C., 2004. VP1 of Foot-and-Mouth Disease Virus Induces Apoptosis via the Akt Signaling Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 10 (52168 – 52174).

- Perez, J.M., Simeoe, F.J., Saeki, Y., Josephson, L., Weissleder, R., 2003. Viral-induced self-assembly of magnetic nanoparticles allows the detection of viral particles in biological media. *Journal of the American Chemical Society*, 125 (10192 – 10193).
- Prendergast, F., e Mann, K., 1978. Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskalea*. *Biochemistry*, 17 (3448 – 3453).
- Pérez-Filgueiraa, D.M., Brayfielda, B.P., Phiria, S., Borcab, M.B., Wooda, C., Morrisa, T.J., 2004. Preserved antigenicity of HIV-1 p24 produced and purified in high yields from plants inoculated with a tobacco mosaic virus (TMV)-derived vector. *Journal of Virological Methods*, 121 (201 – 208).
- Porath, J., 1992. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expression and Purification*, 3 (263 – 281).
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G., 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258(598 – 599).
- Powilleit, F., Breinig, T., Schmitt, M.J., 2007. Exploiting the Yeast L-A Viral Capsid for the In Vivo Assembly of Chimeric VLPs as Platform in Vaccine Development and Foreign Protein Expression. *PLoS ONE*, 2 (5).
- Prasad, B.V., Hardy, M. E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M.G., Estes M.K., 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*, 286 (287 – 290).
- Qintana, A., Sanchez, L., Larralde, O., Anderson, D., 2005. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in residents of a district in Havana, Cuba. *Journal of Medical Virology*, 76 (69 – 70).
- Rea, D., e Fulop, V., 2006. Structure – Function Properties of Prolyl Oligopeptidase Family Enzymes. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 44 (349 – 365).
- Report, B., Taube, S., Kurth, A., Schreier, E., 2005. Generation of recombinant Norovirus-like particles (VLP) in the human endothelial kidney cell line 293T. *Archives of Virology*, 150 (1425 – 1431).
- Reuter, G., Krisztalovics, K., Vennema, H., Koopmans, M., e Szucs, G., 2005. Evidence of the etiological predominance of norovirus in gastroenteritis outbreaks--emerging new-variant and recombinant noroviruses in Hungary. *Journal of Medical Virology*, 76 (598 – 607).

- Rinderknecht, E., O'Connor, B.H., Rodriguez, H., 1984. Natural human interferon- γ : complete amino acid sequencing and determination of site of glycosylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 259 (6790 – 6797).
- Rubio, V., Shen, Y., Saijo, Y., Liu, Y., Gusmaroli, G., Dinesh-Kumar, S.P., Deng, X.W., 2005. An alternative tandem affinity purification strategy applied to *Arabidopsis* protein complex isolation. *The Plant Journal*, 41 (767 – 778).
- Russel, R.B., Alber, F., Aloy, O., Davis, F.P., Korkin, D., Pichaud, M., Topf, M., Sali, A., 2004. A structural perspective on protein - protein interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 14 (313 – 324).
- Shi, S., Xue, J., Fan, K., Kou, G., Wang, H., Guo, Y., 2005. Preparation and characterization of recombinant protein ScFv (CD11c)-TRP2 for tumor therapy from inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 10 (1016).
- Silva, M.E., e Franco, T.T., 2000. Extraction and purification of soybean peroxidase (*Glycine max*) by metal affinity partitioning in aqueous two phase systems. *Life Sciences*, 743 (287 – 294).
- Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R., Martin, S. J., 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9 dependent manner. *The Journal of Cell Biology*, 144 (281 – 292).
- Smith, G.D., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S.J., Worobey, M., Pybus, O.G., Ma, S.K., Cheung, C.L., Raghwani, J., Bhatt, S., Peiris, J.S., Guan, Y., Rambaut, A., 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*, 459 (1122 – 1125).
- Sopko, R., Huang, D., Preston, N., Chua, G., Papp, B., Kafadar, K., Snyder, M., Oliver, S.G., Cyert, M., Hughes, T.R., Boone, C., Andrews, B., 2006. Mapping pathways and phenotypes by systematic gene over expression. *Molecular Cell*, 21 (319 – 330).
- Srinivasula, S.M., Fernandes-Alnemri, T., Zangrilli, J., Robertson, N., Armstrong, R.C., Wang, L., Trapani, J.A., Tomaselli, K.J., Litwack, G., Alnemri, E.S., 1996. The Ced-3/interleukin 1 β converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2 α are substrates for the apoptotic mediator CPP32. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 (27099 – 27106).

- Sun, Z., Chen, J., Yao, H., Liu, L., Wang, J., Zhang, J., Liu, J.N., 2005. Use of Ssp dnaB derived mini-intein as a fusion partner for production of recombinant human brain natriuretic peptide in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 43 (26 – 32).
- Tan, M., Zhong, W., Song, D., Thornton, S., Jiang, X., 2004. *E. coli*-expressed recombinant norovirus capsid proteins maintain authentic antigenicity and receptor binding capability. *Journal of Medical Virology*, 74 (641 – 649).
- Tang, W., Sun, Z.Y., Pannell, R., Gurewich, V., Liu, Y.N., 1997. An efficient system for production of recombinant urokinase type plasminogen activator. *Protein Expression and Purification*, 11 (279 – 283).
- Terpe, K., 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60 (523 – 533).
- Teunis, P.F., Moe, C.L., Liu, P., Miller, S.E., Lindesmith, L., Baric, R.S., Pendu, J.L., Calderon, R.L., 2008. Norwalk virus: How infectious is it? *Journal of Medical Virology*, 80 (1468 – 1476).
- Thiel, H.J., e Konick, M., 1999. Caliciviruses: an overview. *Veterinary Microbiology*, 69 (55 – 62).
- Toker, A., 2000. Protein kinase as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Molecular Pharmacology*, 57 (652 – 658).
- Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W.J., Ammerer, G., Hall, B.D., 1982. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*, 298 (347 – 350).
- van Duynhoven, Y.T., Jager, C.M., Kortbeek, L.M., Vennema, H., Koopmans, M.P., van Leusden, F., van der Poel, W.H., van den Broek, M.J., 2005. A one-year intensified study of outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *Epidemiology and Infection*, 133 (9 – 21).
- Villa, L.L., 2003. Vaccines against human papillomavirus infections and disease. *Salud pública de México*, 45 (443 – 448).
- Vries, E.G.E., Hooge, M.N., Gietema, J.A., Jong, S., 2003. Correspondence re: C.G. Ferreira et al., Apoptosis: Target of Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 9 (912).
- Xia, M., Farkas, T., Jiang, X., 2007. Norovirus Capsid Protein Expressed in Yeast Forms Virus-like Particles and Stimulates Systemic and Mucosal Immunity in Mice

- Following an Oral Administration of Raw Yeast Extracts. *Journal of Medical Virology*, 79 (74 – 83).
- Walhout, A.J.M., Temple, G.F., Brasch, M.A., Hartley, J.L., Lorson, M.A., Thorner, J., Vidal, M., 2000. Gateway recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods Enzymology* 328 (575 – 592).
- Wang, J.H., Liang, C.M., Peng, J.M., Shieh, J.J., Jong, M.H., Lin, Y.L., Sieber, M., Liang, S.M., 2003. Induction of immunity in swine by purified recombinant VP1 of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 21 (3721 – 3729).
- Wang, Q.H., Han, M.G., Cheetham, S., Souza, M., Funk, J.A., Saif, L.J., 2005. Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerging Infectious Diseases journal*, 11 (1874 – 1881).
- White, W.I., Wilson, S.D., Palmer-Hill, F.J., Woods, R.M., Ghim, S.J., Hewitt, L.A., Goldman, D.M., Burke, S.J., Jenson, A.B., Koenig, S., Suzich, J.A., 1999. Characterization of a major neutralizing epitope on human papillomavirus type 16 L1. *Journal of Virology*, 73 (4882 – 4889).
- White, L.J., Ball, J.M., Hardy, M.E., Tanaka, T.N., Kitamoto, N., Estes, M.K., 1996. Attachment and entry of recombinant Norwalk virus capsids to cultured human and animal cell lines. *Journal of Virology*, 70 (6589 – 6597).
- Widdowson, M., Rockx, B., Schepp, R., van der Poel, W., Vinje, J., van Duynhoven, Y.T., Koopmans, M.P., 2005. Detection of serum antibodies to bovine norovirus in veterinarians and the general population in the Netherlands. *Journal of Medical Virology*, 76 (119 – 128).
- Wigdorovitz, A., P´erez-Filgueira, D.M., Robertson, N., Carrillo, C., Sadir, A.M., Morris, T.J., Borca, M.V., 1999. Protection of mice against challenge with foot and mouth disease virus (FMDV) by immunization with foliar extracts from plants infected with recombinant tobacco mosaic virus expressing the FMDV structural protein VP1. *Virology*, 264 (85 – 91).
- Wobus, C.E., Karst, S.M., Thackray, L.B., Chang, K.O., Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., Krug, A., Mackenzie, J.M., Green, K.Y., Virgin, H.W., 2004. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biology*, 2 (432).

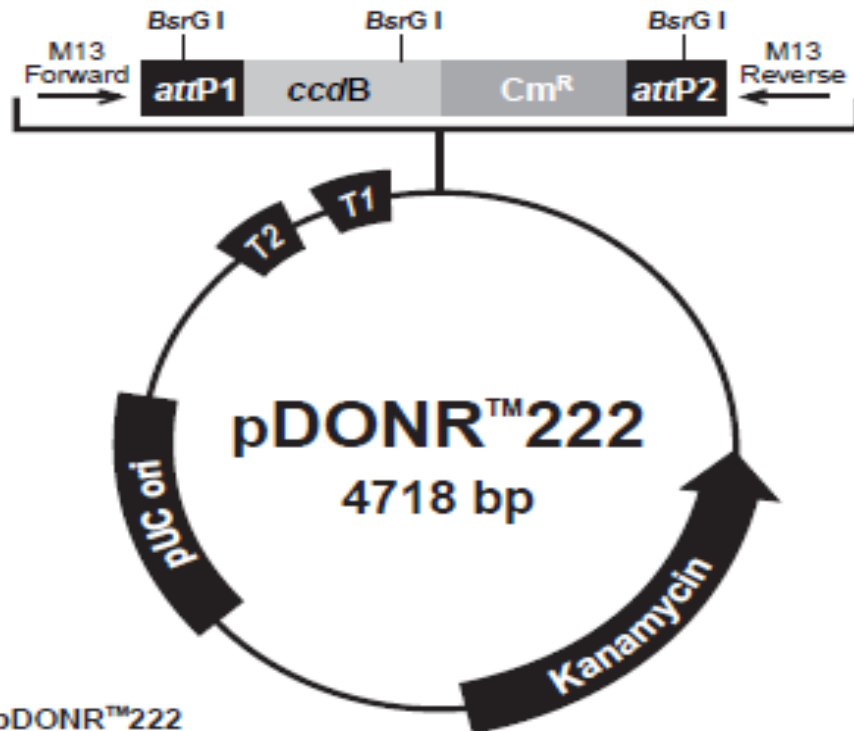
- Yin, J., Li, G., Ren, X., Herrler, G., 2007. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, 127 (335 – 347).
- Zahorsky, J., 1929. Hyperemesis hemis or the winter vomiting disease. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*, 46 (391 – 395).
- Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J.P., Stewart, A.F., 1998. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nature Genetics*, 20 (123 – 128).
- Zheng, D.P., Ando, T., Fankhauser, R.L., Beard, R.S., Glass, R.I., Monroe, S.S., 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, 346 (312 – 323).
- Zhuang, R., Zhang, Y., Zhang, R., Conceição, C., Yang, K., Yang, A., Jin, B., 2008. Purificação de proteínas de fusão GFP com alta pureza e rendimento por cromatografia em coluna de anticorpos monoclonais acoplados afinidade. *Protein Expression and Purification*, 59 (138 – 143).
- Zolotukhin, S., Byrne, B.J., Mason, E., Zolotukhin, I., Potter, M., Chesnut, K., Summerford, C., Samulski, R.J., Muzyczka, N., 1999. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Therapy*, 6 (973 – 985).

Bibliografia de Internet

- Addgene - <http://www.addgene.org/14155/> (20/01/2011)
- Invitrogen - <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Global/molecular-biology-cell-biology-applications.html> (17/10/2010).
- Gateway Cloning (manual) - <http://wolfson.huji.ac.il/expression/gatewayman.pdf> (20/07/2011).
- GE Healthcare - http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/content/lifesciences_homepage?OpenDocument&cmpid=ppcaw100 (16/05/2011).
- Replicação do vírus - www.scq.ubc.ca/viral-infection/ (20/06/2011).

Anexos

Anexo 1

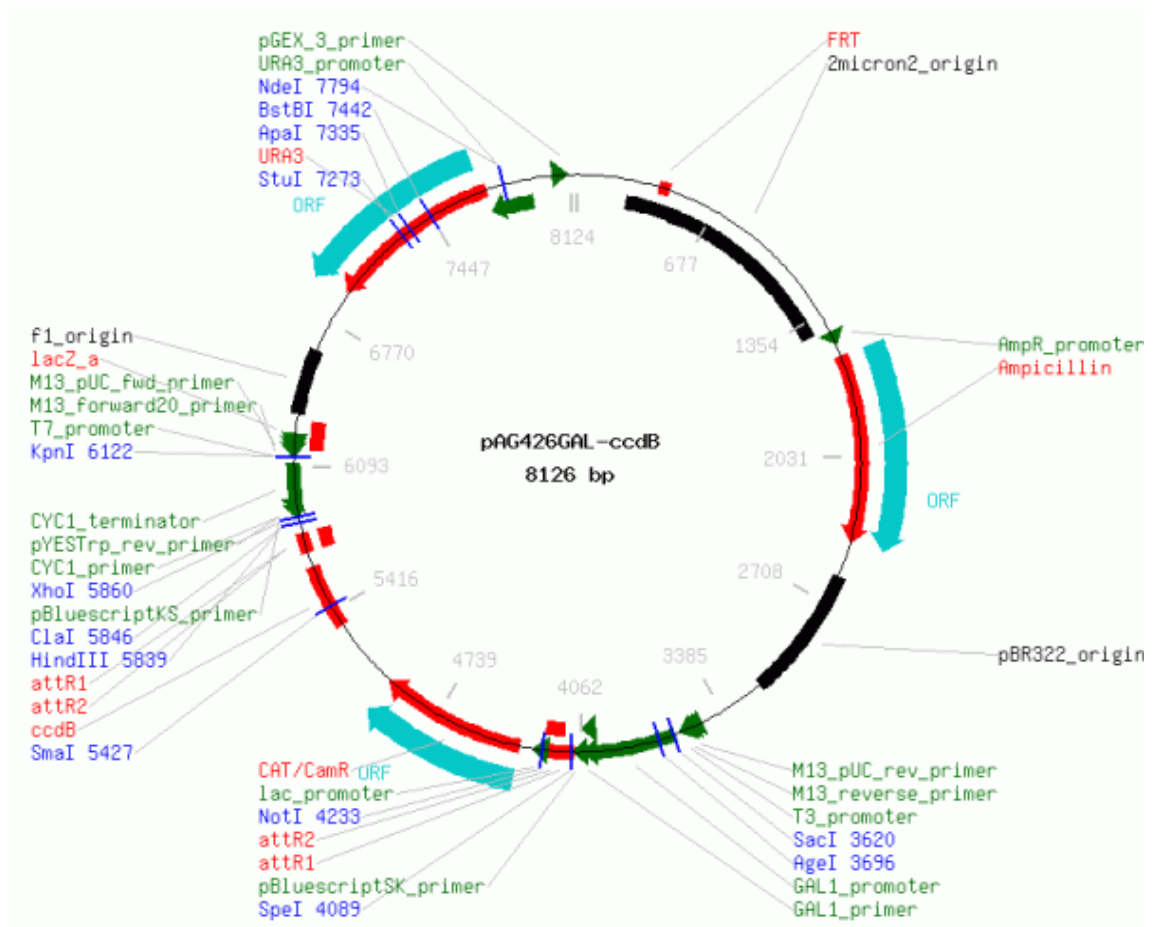


Comments for pDONR™222 4718 nucleotides

mmB T2 transcription termination sequence: bases 58-85 (c)
mmB T1 transcription termination sequence: bases 217-260 (c)
M13 Forward (-20) priming site: bases 327-342
attP1: bases 360-591
BsrG I restriction sites: bases 442, 1232, 2689
ccdB gene: bases 987-1292 (c)
Chloramphenicol resistance gene: bases 1612-2295 (c)
attP2: bases 2543-2774 (c)
M13 Reverse priming site: bases 2816-2832
Kanamycin resistance gene: bases 2899-3714 (c)
pUC origin: bases 4045-4718
(c) = complementary strand

Vetor do sistema da Gateway™ (pDONR™ 222), com o uso da enzima topoisomerase para a ligação do produto de PCR, em substituição de uma enzima de restrição e uma ligase na formação do vetor de entrada. De notar a presença dos sítios de recombinação attP1 e attP2, que se recombina com os sítios attB1 e attB2 presentes no gene amplificado por PCR (adaptado da Invitrogen <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Global/molecular-biology-cell-biology-applications.html>). Este vetor participa na reação denominada BP. Gene com resistência a canamicina.

Anexo 2



Vetor de destino pAG426GAL-ccdB com os sítios attR, usado na reação de recombinação com os vetores de entrada obtidos na reação BP. Observação do local de recombinação dos sítios attR1 e attR2 com os sítios attL1 e attL2, na reação LR, gene com resistência a ampicilina. Este vetor permite assim a expressão da proteína da cápside em meio galatosado (adaptado da Addgene - <http://www.addgene.org/14155/>). Estes plasmídeo contem a marca de seleção URA3.