

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

FACULTAT DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I ECOLOGIA



**APROXIMACIONES MOLECULARES AL  
ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DE  
ROTAVIRUS Y NOROVIRUS CON EL  
HUÉSPED**

TESIS DOCTORAL

Programa doctorado 3102

Biomedicina y Biotecnología

**Susana Vila Vicent**

Dirigida por:

Dr. Jesús Rodríguez Díaz

Dr. Javier Buesa Gómez

Junio 2020





VNIVERSITAT ID VALÈNCIA [67] Facultat de Medicina i Odontologia

Departament de Microbiologia i Ecologia

**Javier Buesa Gómez**, Doctor en Medicina y Catedrático de Microbiología de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València, y **Jesús Rodríguez Díaz**, Doctor en Biología e Investigador Ramón y Cajal en el Departament de Microbiologia i Ecologia, Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València,

### INFORMAN

Que el presente trabajo de investigación titulado “**APROXIMACIONES MOLECULARES AL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DE ROTAVIRUS Y NOROVIRUS CON EL HUÉSPED**” ha sido realizado bajo nuestra dirección por D<sup>a</sup> **Susana Vila Vicent**, licenciada en Biología, para optar al título de Doctora.

En Valencia, 10 de junio de 2020

**Dr. Javier Buesa Gómez**

**Dr. Jesús Rodríguez Díaz**



*Llegará un momento en que creas que todo ha terminado.  
Ese será el principio.  
Epicurio*



*Als meus pares, germanes  
I al meu company de viatge, Ruben.  
A Tom i Lazy*



## Agradecimientos

Empezar a escribir este apartado de la tesis no es sin duda el más difícil de todos. Echar la vista atrás para recordar tod@s aquellos que habéis sido partícipes de este proyecto se hace una tarea ardua, ya que seguro que alguien se me olvida. Si empezamos a agradecer de forma secuencial, me gustaría agradecer en primer lugar a mis padres la oportunidad de ser quien soy y como soy. Quien lo diría, esos años en los que la “edad del pavo” hacen de la convivencia algo realmente difícil, pero que siempre han confiado en mi y en mi capacidad de superación. Gracias a ellos sigo luchando por cada sueño y ambición. Siguiendo en este punto, a mis hermanas, María y Lorena, esa pequeña revolución que llego a casa de forma “inesperada” pero que nos brindaron unos largos años de alegría y felicidad, aunque también algún sufrimiento que otro. Gracias a ellas por hacerme sentir una buena persona, siempre intentando ayudarlas y que se sientan bien. Sobretudo evitando que cometan mis mismos errores. Dentro del ámbito familiar, no podría olvidarme de mi compañero de viaje, Rubén. Desde el principio has estado a mi lado, acompañándome y apoyándome en todo aquello que me he propuesto, no podría haber escogido un mejor copiloto. Hemos tenido (y tendremos) momentos buenos y no tan buenos, pero espero que siempre contemos uno en el otro. Juntos, añadamos otro capítulo a nuestra saga, por muchos más así. Gracias por tu paciencia y sinceridad característica. Y aunque podría seguir escribiendo de toda la familia que me aporta beneficios personales y por consecuencia laborales, no me olvido de ninguno de vosotros, creo que sería bueno empezar a agradecer a la parte científica y racional de este proyecto.

Jesús y Javier, habéis confiado en mi, me habéis brindado la oportunidad de formar parte de un gran equipo y aprender todo lo que ahora se me olvidará rápidamente. Aunque hayamos tenido momentos de estrés y difíciles, el producto de ese esfuerzo lo tenemos ahora mismo entre las manos. Sois unos grandes científicos, tenéis ambiciones y habéis alcanzado muchos logros.

Jesús, siempre has tenido esa determinación científica que te caracteriza, esa capacidad de ver donde nadie ve y sobre todo, en algunas ocasiones, de hacerlo con un par de cervezas. ¡Cuántos momentos para recordar! Quebramientos de cabeza hasta encontrar por qué esto no sale, o por qué no funciona; largas conversaciones filosóficas de la vida y sus altibajos... ¡Espero que todo vaya genial! Que sigas marcando tendencia y esforzándote para alcanzar todas tus metas.

Javier, fuiste el primero que me dio la oportunidad de empezar mi carrera científica ¡aún recuerdo ese día de paseo por el laboratorio! Lo difícil que se me hacía hablar en castellano y las “espardeñas” que soltaba. Lo que más me sorprendía y lo sigue haciendo son tus conocimientos de historia, de lengua, de microbiología, en fin en cada conversación consigues atraer totalmente la atención del oyente y por supuesto hacerle aprender miles de cosas nuevas. Gracias por todo, creo que ahora soy un poco más culta y se hablar el castellano.

A mis compis del laboratorio, empezando por Manuel quien me enseñó a ser paciente y metodológica además de cuidada en los experimentos, a Noelia, de quien no me podría olvidar nunca, han sido muchos años, muchas penas y alegrías contadas, mucha ayuda mutua y grandes confianzas. A Cristina, que nos trajo un poco de mala leche al laboratorio acompañada de la locura que la caracteriza y después nos sorprendió con un bebecito, que nadie se lo creía.

¿Te acuerdas de aquellas tardes después de comer que nos quedábamos viendo el club de la comedia, por que nuestras neuronas ya no daban para más? Muchas historias que guardamos, historias con el vórtex, con termocicladores... A Rober, un pequeño desastre dentro del caos del labo, cuantos tubos sin rotular, pero ¡cuantas cuestiones resueltas por él! La ayuda que nos ha proporcionado a todos ha marcado una nueva etapa en el laboratorio. Y nuestra última incorporación que no por eso menos importante, Noemi, con su habitual buen humor y algunas cosillas rarillas, pero que la hacen la persona entrañable que es. No me gustaría dejarme a nadie de todos los que habéis estado durante todo este tiempo, aunque haya sido de forma esporádica como Irene, Nazaret, Juliana, Sibelle... Que como digo, conmigo han sido estancias esporádicas, pero que espero que consigáis vuestro sitio en el labo, continuéis formándoos como científicos y aprovechando cada oportunidad que os brinden.

Para terminar con los agradecimientos, a mis amigas, aquellas que han estado toda mi vida conmigo, me conocen y saben que dentro de mi frikismo absoluto y de mis cosas raras me aceptan y quieren como soy. Además de haberme aguantado durante todo este tiempo con mis desvaríos mentales, en fiestas, bodas, bautizos y comuniones. Por muchas más fiestas todas juntas y mejores recuerdos.

A todos, muchas gracias



## Tabla de contenido

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Norovirus .....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Estructura y composición .....	6
1.1.2. Genoma y proteínas.....	10
1.1.3. Diversidad molecular de norovirus.....	14
1.1.4. Replicación .....	18
1.1.5. Interacciones virus-célula .....	20
<b>1.2. Rotavirus.....</b>	<b>25</b>
1.2.1 Clasificación de rotavirus.....	25
1.2.2. Estructura del virión .....	27
1.2.3. Genoma.....	30
1.2.4. Mecanismos de evolución y diversidad .....	32
1.2.5. Replicación del genoma .....	34
1.2.6 Infección celular.....	36
1.2.7. Microbiota intestinal y susceptibilidad a las infecciones por rotavirus y norovirus .....	39
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>44</b>
<b>3. Capítulo I: Caracterización de un nuevo epítipo conformacional de norovirus GII.4: implicaciones para las interacciones de los norovirus con el hospedador .....</b>	<b>46</b>
3.1. Introducción.....	48
3.2. Material y métodos.....	52
3.2.1. Expresión y purificación de VLPs NoV.....	52
3.2.2. Expresión y purificación de partículas P y dominios P de norovirus.....	52
3.2.3. Anticuerpos utilizados en el presente estudio.....	56
3.2.4. Caracterización de anticuerpos por ELISA.....	56
3.2.5. Ensayo de bloqueo de unión a la saliva .....	57
3.2.6. Caracterización del epítipo 3C3G3 mediante “phage display” .....	58
3.2.7. Modelado de epítopos .....	59
3.2.8. Mutagénesis dirigida .....	60
3.2.9. Resonancia superficial de plasmón (SPR).....	62
3.2.10. Unión de partículas P a neoglicoconjugados .....	63
3.3. Resultados.....	66
3.3.1. Producción y purificación de partículas P de norovirus.....	66
3.3.2. Caracterización del anticuerpo monoclonal (MAb) por ELISA.....	68
3.3.3. El anticuerpo monoclonal (Mab) 3C3G3 bloquea la unión de las partículas P a la saliva .....	70
3.3.4. Caracterización del epítipo del anticuerpo monoclonal 3C3G3 por “phage display” y mutagénesis dirigida .....	70
3.3.5. Caracterización del epítipo MAb 3C3G3 por resonancia superficial de plasmón (SPR).....	75
3.3.6. El residuo R397 está involucrado en el reconocimiento de HBGA .....	77
3.4. Discusión.....	80
<b>4. Capítulo II: Descifrando la función del antígeno secretor en la adhesión de rotavirus humanos a los antígenos histo-sanguíneos .....</b>	<b>84</b>
4.1. Introducción .....	86

<b>4.2.</b>	<b>Material y métodos</b> .....	<b>90</b>
4.2.1.	Expresión y purificación de las proteínas VP8* de rotavirus.....	90
4.2.2.	Mutagénesis dirigida .....	92
4.2.3.	Ensayos de unión de VP8* a glicanos .....	92
4.2.4.	Ensayos de bloqueo de unión.....	94
4.2.5.	Producción de partículas completas de rotavirus.....	95
4.2.6.	Ensayos de unión del rotavirus de triple capa (TLP) y de partículas de doble capa (DLP) con glicanos .....	95
4.2.7.	Bloqueo de la infección por rotavirus en las células MA104.....	96
4.2.8.	Análisis de resonancia superficial de plasmón (SPR).....	97
4.2.9.	Cristalización y recogida de datos.....	99
4.2.10.	Construcción de modelos .....	100
4.2.11.	Análisis estadístico.....	101
<b>4.3.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>102</b>
4.3.1.	El dominio VP8* de rotavirus del genotipo P[8] reconoce lacto-N-biosa, el precursor del antígeno H tipo-1 .....	102
4.3.2.	La lacto-n-biosa soluble (LNB) y la galacto-N-biosa (GNB) bloquean parcialmente la unión de VP8* al antígeno H-tipo 1 y a su precursor .....	107
4.3.3.	Los glicanos unen VP8* en un sitio de unión preformado .....	109
4.3.4.	Sitio de unión P[8] al glicano.....	114
4.3.5.	Papel de la fucosilación de Lacto-N-biosa en la interacción con la VP8* P[8]	117
4.3.6.	Diferencias estructurales sutiles afectan a la afinidad y especificidad de la unión del glicano .....	120
<b>4.4.</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>124</b>
<b>5.</b>	<b>Capítulo III: Estudio seroepidemiológico de la proteína VP8* de rotavirus pertenecientes a diferentes genotipos P en Valencia, España.</b>	<b>132</b>
<b>5.1.</b>	<b>Introducción</b> .....	<b>134</b>
<b>5.2.</b>	<b>Material y métodos</b> .....	<b>138</b>
5.2.1.	Expresión y purificación de VP8* recombinante.....	138
5.2.2.	Recogida de muestras .....	138
5.2.3.	Determinación de anticuerpos IgG anti-VP8* en muestras de suero.....	139
5.2.4.	Determinación de anticuerpos IgG anti-Wa rotavirus en muestras de suero	140
5.2.5.	Genotipado del estado secretor .....	140
5.2.6.	Análisis estadísticos.....	142
<b>5.3.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>144</b>
5.3.1.	Expresión y purificación de la proteína VP8* de rotavirus de varios genotipos <sup>144</sup>	
5.3.2.	Prevalencia de anticuerpos anti VP8* en suero.....	145
5.3.3.	Títulos de anticuerpos séricos contra las proteínas VP8* de rotavirus... <sup>146</sup>	
5.3.4.	Estado secretor y respuesta de los anticuerpos a las proteínas VP8* de rotavirus <sup>148</sup>	
<b>5.4.</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>152</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	<b>158</b>
<b>7.</b>	<b>Anexo</b> .....	<b>162</b>
<b>8.</b>	<b>Bibliografía</b> .....	<b>166</b>

## Listado de abreviaturas:

<b>NoV</b>	Norovirus
<b>RV</b>	Rotavirus
<b>SPR</b>	<i>Surface plasmon resonance</i> (Resonancia superficial de plasmón)
<b>HBGA</b>	<i>Histo-blood group antigens</i> (Antígenos histosanguíneos)
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin</i> Albúmina sérica bovina
<b>HSA</b>	<i>Human serum albumin</i> Albúmina sérica humana
<b>MAb</b>	Anticuerpo monoclonal
<b>P-PAb</b>	Anticuerpo policlonal
<b>MuNoV</b>	Norovirus murino
<b>VLP</b>	<i>Virus-like particles</i> Partícula pseudovírica
<b>rVLP</b>	<i>Recombinant virus-like particles</i> Partícula pseudovírica recombinante
<b>ORF</b>	<i>Open reading frame</i> Pauta abierta de lectura
<b>RdRp</b>	RNA polimerasa RNA dependiente
<b>G(I-X)</b>	Genogrupos norovirus
<b>P[X]</b>	Genotipo VP4 rotavirus. Sensible proteasa
<b>G1-x</b>	Genotipo VP7 rotavirus. Glicoproteína

<b>TLP</b>	<i>Triple-layered particle</i> Partícula vírica de triple capa
<b>DLP</b>	<i>Double-layered particle</i> Partícula vírica de doble capa
<b>ssRNA</b>	RNA de simple cadena
<b>dsRNA</b>	RNA de doble cadena
<b>UTR</b>	Fracción no traducible del genoma
<b>SA</b>	Ácido siálico
<b>NA</b>	Neuraminidasa
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MMTV</b>	Virus del tumor mamario murino
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PBS-T</b>	Tampón fosfato salino con Tween-20
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>TBS-T</b>	Tampón Tris salino con Tween 20
<b>LNB</b>	Lacto-N-Biosa
<b>GNB</b>	Galacto-N-biosa
<b>FUT</b>	Fucosil-transferasa
<b>H1</b>	Antígeno H tipo 1 (Secretor)
<b>Le<sup>b</sup></b>	Lewis b
<b>Le<sup>a</sup></b>	Lewis a
<b>Fuc</b>	Fucosa
<b>LacNAc</b>	N-acetil lactosamina
<b>LNFP I</b>	Lacto-N-fucopentaosa I

<b>Atri</b>	Trisacárido grupo sanguíneo A
<b>Btri</b>	Trisacárido grupo sanguíneo B
<b>GlcNAc</b>	N-acetil glucosamina
<b>GalNAc</b>	N-acetil galactosamina
<b>GST</b>	Glutación-S-transferasa
<b>RU</b>	Unidades de resonancia
<b>KD<sub>a</sub></b>	Constante de afinidad aparente
<b>FBS-DMEM</b>	Medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%.
<b>PAA-biotina</b>	Poliacrilamida-biotina
<b>PDB</b>	Base de datos de proteínas
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetraacético
<b>HMO</b>	Oligosacáridos de la leche humana
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>se-se-</b>	Estado no secretor (homocigótico)
<b>Se+se-</b>	Estado secretor (heterocigótico)
<b>Se+Se+</b>	Estado secretor (homocigótico)
<b>W</b>	Triptófano
<b>L</b>	Leucina
<b>K</b>	Lisina
<b>Y</b>	Tirosina
<b>G</b>	Glicina
<b>R</b>	Arginina
<b>T</b>	Treonina

---

**E**

Ácido glutámico

---

**N**

Asparagina

---

## Resumen

Los norovirus humanos son los principales agentes etiológicos de gastroenteritis aguda en todo el mundo. Aunque los norovirus son muy diversos (se han detectado más de 30 genotipos en humanos), durante los últimos 40 años la mayoría de los brotes y epidemias han sido causados por cepas del genotipo GII.4, lo que plantea interrogantes sobre su persistencia en la población. Entre otras posibles explicaciones, se considera que la evasión inmunológica es la principal causa de su éxito. Para estudiar en detalle el reconocimiento y la evasión de anticuerpos, analizamos un epítipo conformacional reconocido por un anticuerpo monoclonal (3C3G3) mediante mutagénesis dirigida y resonancia superficial de plasmón (SPR, por sus siglas en inglés). Los resultados muestran que el epítipo predicho está compuesto por 11 aminoácidos dentro del dominio P de la cápside vírica. Sólo dos de ellos difieren de la variante homóloga (GII.4 Den-Haag\_2006b) y de la variante pre-epidémica (GII.4 VA387\_1996) que no es reconocida por el anticuerpo. Además, un solo cambio de aminoácido es capaz de modificar el patrón de reconocimiento de los antígenos histo-sanguíneos (HBGA). Estos resultados proporcionan evidencia de que el epítipo reconocido por el anticuerpo 3C3G3 está involucrado en las interacciones virus-huésped, tanto a nivel inmunológico como en el reconocimiento de los receptores celulares.

Los rotavirus humanos son los principales agentes causantes de gastroenteritis aguda en niños pequeños, y además el genotipo P[8] representa más del 80% de las infecciones en humanos. Se han determinado las bases moleculares de la unión del dominio VP8\* de la proteína VP4 del genotipo P[8] a

su receptor celular, el antígeno H tipo 1 (Fuc-  $\alpha$  1,2-Gal-  $\beta$  1,3-GlcNAc; H1) y a su precursor lacto-N-biosa (Gal-  $\beta$  1,3-GlcNAc; LNB). La resolución de las estructuras cristalinas de P[8] en complejos con el antígeno H1 y LNB y los experimentos de mutagénesis dirigida revelaron que ambos glicanos se unen a la proteína P[8] VP8\* a través de un sitio de unión compartido con otros miembros del genogrupo P[II], es decir; P[4], P[6] y P[19]. Los resultados muestran que la fracción L-fucosa de H1 sólo muestra contactos indirectos con P[8] VP8\*. Sin embargo, los cambios conformacionales inducidos en la fracción de la LNB duplican la afinidad del ligando, según las medidas por SPR lo que proporciona una explicación molecular a la diferente susceptibilidad a la infección por rotavirus entre individuos secretores y no secretores. La inesperada interacción de P[8] VP8\* con la LNB, un componente básico de los oligosacáridos de la leche humana de tipo 1, dio lugar a la inhibición de la infección por rotavirus, lo que pone de manifiesto el papel y la posible aplicación de este disacárido como antiviral. A pesar de que los aminoácidos clave en el sitio de unión H1/LNB están altamente conservados en los miembros del genogrupo P[II], se han encontrado diferencias en las afinidades de ligandos entre los distintos linajes de P[8]. La variación en las afinidades se explica por sutiles diferencias estructurales inducidas por cambios en los aminoácidos de las proximidades al sitio de unión, que proporcionan un mecanismo de ajuste para la unión del glicano en el bolsillo de unión a la VP8\* de los rotavirus del genotipo P[8].

Un último objetivo del presente trabajo fue determinar la prevalencia y el título de los anticuerpos séricos frente a varios genotipos de la proteína VP8\* de rotavirus en niños y adultos en Valencia, España, y determinar el papel del

estado secretor (polimorfismo FUT2<sub>G428A</sub>) en la respuesta serológica. Se utilizaron las proteína VP8\* de los genotipos P[4], P[6], P[8], P[9], P[11], P[14] y P[25] que fueron analizadas por ELISA con 88 muestras de sueros de niños (n=41, 3.5 años de edad en promedio) y de adultos (n=47, 58 años de edad en promedio). El conjunto de 55 muestras fueron genotipadas para el polimorfismo FUT2<sub>G428A</sub> y se compararon los títulos de anticuerpos. Se encontraron diferencias en la seroprevalencia entre niños y adultos para los genotipos P[4], P[8] y P[11]. De manera similar, se encontraron diferencias significativas entre adultos y niños en los títulos de anticuerpos contra los genotipos P[4], P[8] y P[11], teniendo los niños títulos de anticuerpos más altos que los adultos. Curiosamente, se encontraron muestras positivas para genotipos raros como P[11] (sólo en niños), P[14] y P[25]. Aunque no se encontraron diferencias estadísticas en los títulos de anticuerpos entre secretores y no secretores para ninguno de los genotipos P estudiados, se encontró una prevalencia estadísticamente significativa más alta para el genotipo P[25] en los individuos secretores en comparación con los no secretores. Finalmente, para profundizar en el estudio de la susceptibilidad entre secretores y no secretores se estudió el título de anticuerpos frente al rotavirus completo de la cepa Wa G1P[8], encontrándose diferencias estadísticamente significativas en este caso.



# **INTRODUCCIÓN GENERAL**



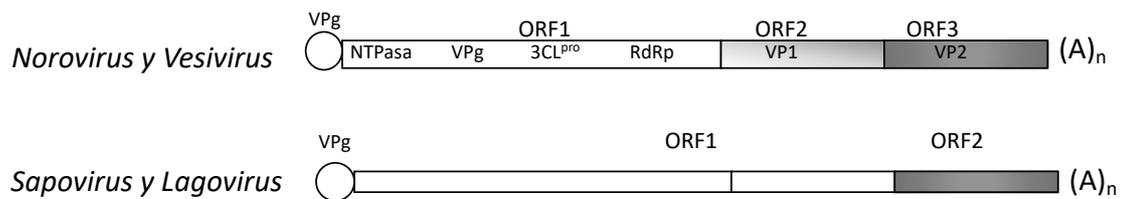
# 1. Introducción

## 1.1. Norovirus

La familia *Caliciviridae* se divide en 7 géneros que infectan a humanos y animales *Lagovirus*, *Norovirus*, *Nebovirus*, *Recovirus*, *Sapovirus*, *Valovirus* y *Vesivirus* (Desselberger 2019; Vinjé *et al.*, 2019). El prototipo de norovirus, Norwalk virus, fue descrito por primera vez el 1972 como el agente etiológico de un brote de gastroenteritis aguda en un colegio de primaria en Norwalk, Ohio (Kapikian, 2000). Posteriormente, los norovirus han demostrado ser los causantes de la mayoría de los brotes de gastroenteritis aguda no bacteriana. Actualmente, los norovirus se reconocen como la causa principal de casos esporádicos de diarrea en la comunidad (Estes *et al.*, 2006; Glass *et al.*, 2000; Lopman *et al.*, 2003) y se detectan hasta en un 95% de los brotes de gastroenteritis vírica analizados durante 4-5 años en EEUU (Fankhauser *et al.*, 2002). De igual modo, se han detectado altos porcentajes en otros países industrializados (Koopmans *et al.*, 2000; Lopman *et al.*, 2003; Maguire *et al.*, 1999).

Las características comunes de todos los miembros de la familia *Caliciviridae* incluyen la presencia de una única proteína estructural mayoritaria a partir de la cual se construye la cápside, y la aparición de 32 depresiones en forma de copa en la superficie del virión dispuestas con una simetría icosaédrica. El nombre de la familia deriva de la palabra en latín *calix*, que significa copa, y se refiere a los huecos superficiales del virión (Madeley, 1979). Otra característica es la ausencia de una caperuza metilada o de sitios de entrada ribosomales (IRES) en el extremo 5' del RNA viral. En su lugar, una proteína pequeña (VPg) de ~10-12 KDa se une covalentemente al RNA viral y se ha descrito que es esencial

para la infectividad del RNA (Black *et al.*, 1978). Esto se ha descrito también para otros calicivirus (Burroughs & Brown, 1978). La proteína VPg interactúa con factores de traducción (eIF3, eIFGI, eIF4E y la proteína ribosomal S6) y puede jugar un papel importante en la iniciación de la traducción del RNA (Daughenbaugh *et al.*, 2003). La unión de la proteína VPg al RNA viral se cree que ocurre durante la replicación del genoma vírico, donde la VPg se une como un cebador proteico al extremo 5' del RNA genómico (Rohayem *et al.*, 2006). Pequeñas diferencias en la organización del genoma distinguen unos géneros de otros dentro de la familia *Caliciviridae* (Figura 1).



**Figura 1.** Organización genómica de cuatro de los géneros dentro de la familia *Caliciviridae*. Norovirus y Vesivirus tienen 3 pautas abiertas de lectura que codifican para las proteínas no estructurales, la proteína mayoritaria de la cápside (VP1) y la proteína minoritaria de la cápside (VP2) (Adaptado de Buesa & Rodríguez-Díaz., 2016).

Los norovirus tienen un genoma de RNA poliadenilado de simple cadena de sentido positivo con tres pautas abiertas de lectura (ORF) (Lambden *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994). El virión tiene una densidad de 1.33-1.41 g/cm<sup>3</sup> en cloruro de cesio (CsCl) (Caul & Appleton 1982; Madore *et al.*, 1986) y generalmente carece de la morfología distintiva de calicivirus (hendiduras en forma de copa) cuando se observa al microscopio electrónico. Los norovirus se describían como pequeños virus redondos estructurados (SRSV, del inglés *small round structured viruses*).

Los calicivirus entéricos de animales son una causa importante de gastroenteritis en animales domésticos, como terneros y cerdos. Los norovirus murinos se han

aislado de ratones inmunodeficientes e inmunocompetentes de laboratorio, pero su patogenicidad es diferente a la causada por norovirus humanos.

A parte de los numerosos intentos, los norovirus humanos no se han podido replicar con éxito en cultivos celulares hasta hace poco tiempo (Ettayebi et al., 2016; Jones et al., 2015), lo que ha condicionado muchos aspectos de su investigación. No obstante, se han realizado progresos considerables mediante el análisis del cDNA generado a partir del RNA genómico de los viriones en muestras fecales. De hecho, la era molecular de investigación en norovirus empezó con la clonación de los genomas de virus Norwalk y Southampton procedentes de muestras fecales (Jiang *et al.*, 1993; Lambden *et al.*, 1993). A diferencia de los calicivirus humanos, muchos calicivirus animales se han conseguido propagar en cultivos celulares, incluyendo los calicivirus de primates (Smith *et al.*, 1983), calicivirus felinos (FCV) (Love & Sabine, 1975) y los virus de leones marinos de San Miguel (Smith *et al.*, 1973). Estos virus proporcionan una herramienta directa para el estudio de las infecciones, la transcripción del genoma, la traducción de las proteínas y la replicación del virus (Green *et al.*, 2002). Además, la información obtenida del estudio de los calicivirus que replican en cultivos celulares o bien que disponen de un modelo animal, como el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV), es importante para la identificación de características que comparten todos los miembros de la familia *Caliciviridae*.

El norovirus murino (MuNoV) reveló un inesperado tropismo por linajes celulares hematopoyéticos, particularmente células dendríticas y macrófagos (Wobus *et al.*, 2004). El norovirus murino puede cultivarse *in vitro*; la línea celular RAW264.7 se ha utilizado para diseñar experimentos tradicionales de titulación y

purificación de virus. Los norovirus murinos han proporcionado la primera herramienta para estudiar el ciclo de replicación de un norovirus en el laboratorio. A pesar de las diferencias en cuanto a la enfermedad en humanos y ratones, los norovirus murinos poseen una alta similitud genética y constituyen un excelente modelo para estudiar los mecanismos de traducción y replicación de norovirus, así como su patogenicidad e inmunidad. Recientemente, Jones *et al.*, (2014) mostraron que los norovirus humanos pueden propagarse en líneas celulares derivadas de linfocitos B humanos, las células BJAB (Jones *et al.*, 2015). Estos experimentos confirmaron el tropismo de norovirus por los linajes celulares hematopoyéticos. Otro aspecto relevante de las infecciones por norovirus es el papel de la microbiota como cofactor necesario para la unión virus-célula, tal y como se ha demostrado *in vitro* para los norovirus humanos (Jones *et al.*, 2015; Rubio-del-Campo *et al* 2014) e *in vivo* para los murinos.

### **1.1.1. Estructura y composición**

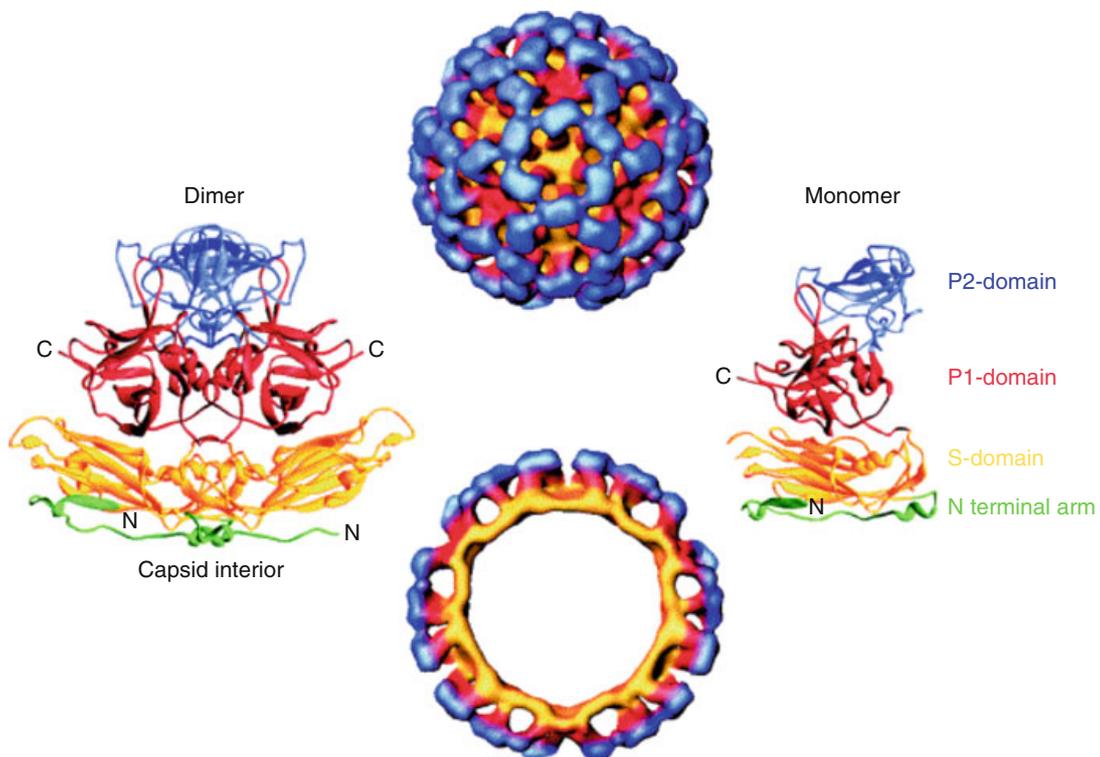
La cápside de Norwalk virus está compuesta por una única proteína estructural mayoritaria, conocida como VP1, y algunas copias de una proteína estructural minoritaria, llamada VP2 (Glass *et al.*, 2000; Prasad *et al.*, 1999). Las estructuras características en forma de copa en la superficie de los viriones, son más prominentes en unas variantes que en otras. La clonación y expresión de las proteínas VP1 y VP2 de norovirus en células de insecto usando el sistema de expresión en baculovirus da lugar al autoensamblaje de la cápside viral y por tanto a la formación de unas partículas recombinantes pseudovíricas (rVLPs, del inglés *recombinant virus-like particles*) que se asemejan antigénica y

estructuralmente a los viriones nativos (Green *et al.*, 1997; Hale *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 2000).

La estructura tridimensional de las rVLPs de Norwalk fue la primera en determinarse por criomicroscopía electrónica, seguido del procesamiento de imágenes a una resolución de 22Å. Estos análisis revelaron que las partículas víricas (38 nm de diámetro mediante estas técnicas) tienen una arquitectura distintiva y exhiben una simetría icosaédrica T=3 (Figura 2). La cápside contiene 180 copias de la proteína VP1 que se ensamblan en 90 dímeros con una estructura en forma de arco. Los arcos están dispuestos de tal manera que hay grandes huecos en las posiciones icosaédricas cinco y tres; estos huecos se ven como estructuras en forma de copa en la superficie de los calicivirus (Prasad *et al.*, 1996, 1999; Prasad *et al.*, 1994). Para formar la estructura icosaédrica T=3, la proteína de la cápside tiene que adaptarse a las tres posiciones quasi-equivalentes, las subunidades que se localizan en estas posiciones se denominan convencionalmente A, B y C. La estructura de alta resolución (3,4 Å) de la cápside del virus Norwalk (norovirus GI.1) se ha determinado mediante cristalografía de rayos X (Prasad *et al.*, 1999).

Cada subunidad o monómero de la proteína de la cápside se pliega en la región N-terminal orientada al interior de la cápside, el dominio S (shell) forma la cara continua de la VLP, mientras que el dominio protuberante (P) forma las protusiones (Figura 2). Una parte flexible de 8 aminoácidos une los dominios S y P. El dominio P se encuentra en el exterior de la cápside y contiene los determinantes específicos de genotipo. El extremo NH<sub>2</sub> (N-terminal) se localiza en el dominio S y está formado por los residuos del 10 al 49 orientados hacia el interior de la cápside. La parte del dominio S que forma los barriles  $\beta$  contiene

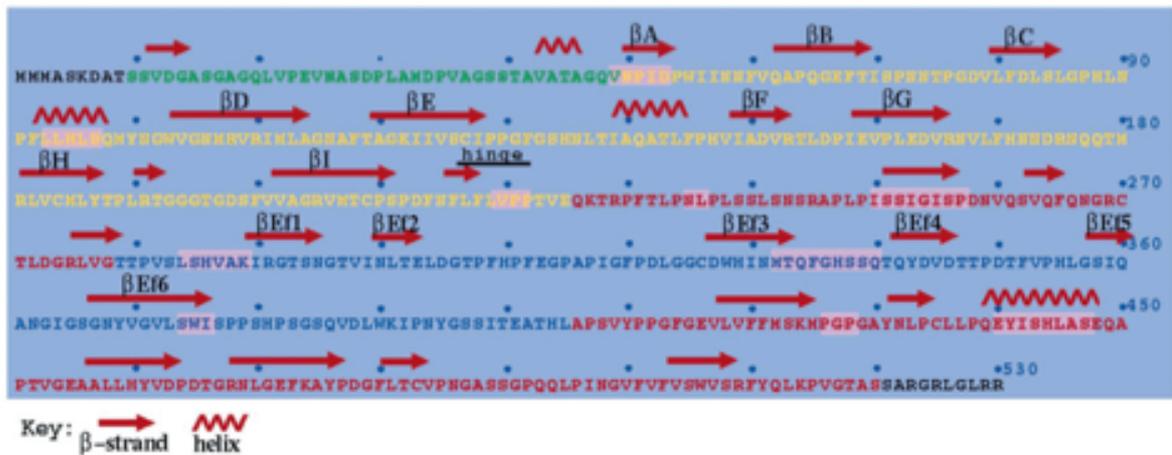
los aminoácidos 50-225. El dominio S entero (aminoácidos 1-225) se corresponde con la región N-terminal de la proteína de la cápside y está relativamente conservada en los norovirus, según las comparaciones de secuencias. Los residuos aminoacídicos 226-530 forman el dominio P, que corresponde con la mitad C-terminal de la proteína de la cápside y forma las estructuras en forma de arco que se extienden a través del dominio shell o de la cubierta. El dominio S es necesario para el ensamblaje de la cápside y además participa en múltiples interacciones moleculares entre dímeros, trímeros y pentámeros.



**Figura 2.** Estructura de las partículas pseudovíricas de la cepa Norwalk resueltas mediante reconstrucción por microscopía crio-electrónica a 22 Å (arriba, representación superficial, abajo, sección transversal) y por cristalografía de rayos X a 3.4 Å. Las VLPs tienen 90 dímeros de la proteína de la cápside (izquierda) ensamblada en una simetría icosaédrica T=3. Cada monómero de la proteína de la cápside (derecha) está dividido en un brazo N-terminal (verde) que mira al interior de la VLP, un dominio S (amarillo) que forma la superficie continua de la VLP y un dominio protuberante (P) que emana de la superficie del dominio S. El dominio P está dividido en dos subdominios, P1 y P2 (rojo y azul, respectivamente) con el subdominio P2 orientado en la cara más superficial de la VLP (Reproducido de Prasad *et al.*, 1999).

El dominio P está involucrado únicamente en las interacciones diméricas (Prasad *et al.*, 1999) y tiene dos subdominios: el P1 formado por los aminoácidos 226-278 y 406-530, y el P2 con los aminoácidos 279-405 (Figura 3). El subdominio P2 es la región más variable de la proteína de la cápside dentro de los norovirus (Hardy *et al.*, 1995) y juega un papel importante en el reconocimiento inmunológico y la interacción con receptores. Se ha demostrado que los dominios P forman dímeros y se unen a los antígenos histo-sanguíneos (HBGAs) sin necesidad de la formación de las VLPs (Tan *et al.*, 2004). Además, el sitio de unión en el dominio P es responsable de las uniones virales a HBGAs y la formación de dicho sitio incluye sólo interacciones intramoleculares (Tan *et al.*, 2003). El dominio S tiene una estructura canónica de barril  $\beta$  con 8 cadenas. El subdominio P2 tiene un plegamiento similar al observado en el factor de elongación Tu (EF-Tu), una estructura nunca antes vista en una proteína de cápside vírica (Prasad *et al.*, 1999). Es más, el plegamiento del subdominio P1 es diferente a cualquier otro polipéptido observado hasta ahora (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2003).

La comparación de proteínas de la cápside de distintos calicivirus revela variaciones significativas en sus secuencias y tamaños. En general, las proteínas de la cápside de los calicivirus humanos son más pequeñas que las de calicivirus animales (Chen *et al.*, 2004). La cápside recombinante de Norwalk puede autoensamblarse en VLPs más pequeñas (23 nm) con una supuesta simetría T=1, la cual se piensa que está compuesta por 60 copias de la proteína de la cápside (White *et al.*, 1997).



**Figura 3.** Secuencia y estructura de la cápside de NoV. El dominio N-terminal se muestra en verde (aminoácidos 10-49), el dominio S (aminoácidos 50-225) en amarillo. El subdominio P1 (aminoácidos 226-278 y 406-530) en rojo y el subdominio P2 (aminoácidos 279-405) en azul. (Reproducido de Prasad *et al.*, 1999)

Se ha propuesto que la región N-terminal de la proteína de la cápside o el RNA genómico actúa como una región de conmutación que controla las variaciones en la conformación de la proteína de la cápside de los virus T=3 (Rossmann & Johnson, 1989). Las partículas de norovirus son diferentes de otros virus T=3, sus proteínas recombinantes de la cápside forman rápidamente las rVLPs sin RNA (Prasad *et al.*, 1999). Se ha sugerido que los determinantes para adquirir la simetría T=3 en los norovirus pueden estar fuera del extremo N-terminal y que la interacción entre las subunidades B y C no es obligatoria para la formación de la cápside (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2003).

### 1.1.2. Genoma y proteínas

Como se ha mencionado anteriormente, todos los calicivirus tienen un genoma de RNA lineal, monocatenario y de polaridad positiva de unas 7.5-7.7 kb (Green *et al.*, 2002). El RNA del genoma de Norwalk virus, el prototipo para el género *Norovirus*, tiene 1654 nucleótidos y está poliadenilado en el extremo 3' (Jiang *et al.*, 1993). La falta de una estructura de caperuza típica de los mRNA de

eucariotas y la ausencia de un sitio interno de entrada al ribosoma sugiere que la proteína VPg realizaría estas funciones en el inicio de la traducción a través de una única interacción proteína-proteína con la maquinaria celular de traducción (Daughenbaugh *et al.*, 2003). El genoma de los calicivirus, está organizado en dos o tres pautas abiertas de lectura (ORFs) excepto el norovirus murino, el cual presenta una cuarta ORF (McFadden *et al.*, 2011). Las proteínas no estructurales codificadas en la ORF1 se predijeron primero en función de las similitudes de secuencia con proteínas no estructurales de picornavirus (Neill, 1990). Los motivos de la secuencia de aminoácidos en común con poliovirus, la 2C NTPasa, la proteasa 3C y la RNA polimerasa dependiente de RNA 3D (RdRp) se identificaron fácilmente y proporcionaron la información necesaria para la caracterización adicional de proteínas no estructurales de calicivirus. Los estudios de mapeo y enzimáticos de poliproteínas traducidas *in vitro* o de la expresión de proteínas recombinantes, confirmaron la presencia de una NTPasa (p41), una 3C proteasa (3CL<sup>pro</sup>), una RNA polimerasa RNA dependiente (RdRP) y la localización de la poliproteína en el genoma unido a la proteína VPg (Dunham *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1996; Pfister & Wimmer 2001). Las seis proteínas no estructurales propuestas codificadas en la ORF1 están definidas desde N terminal a C terminal, p48-NTPasa-p22-VPg-3CL<sup>pro</sup>-RdRp (Ettayebi & Hardy 2003). Se ha publicado que la proteasa 3CL (3CL<sup>pro</sup>) inhibe la traducción en la célula huésped mediante la escisión de la proteína de unión a la cola poli-A (PABP), es una proteína implicada en la traducción de los mRNAs poliadenilados (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2004). Análisis funcionales de la proteína producida por la ORF 4 del norovirus murino demostraron que antagoniza la respuesta inmune a la infección mediante la desregulación del número de genes celulares

activados por la respuesta inmune innata, incluyendo el IFN- $\beta$  (McFadden *et al.*, 2011).

En los géneros *Norovirus* y *Vesivirus* la proteína de la cápside VP1 está codificada en una ORF separada (ORF2), mientras que las proteínas de la cápside de *Sapovirus* y *Lagovirus* están de forma contigua a la poliproteína no estructural (Figura 1). Los virus del género *Norovirus* y *Vesivirus* tienen tres pautas de lectura (ORF1, ORF2 y ORF3). En norovirus la primera y la tercera ORF están en la misma fase. En Norwalk virus, la ORF 3 codifica una proteína estructural minoritaria de 212 aminoácidos (Glass *et al.*, 2000). Todos los genomas de los calicivirus empiezan en una GU en el extremo 5', el cual se repite internamente en el genoma y corresponde con el inicio de un transcrito de RNA subgenómico (2.2-2.4 kb) que es co-terminal con el extremo 3' del genoma. Esto se ha observado tanto en células infectadas por calicivirus felinos y por el virus de la fiebre hemorrágica del conejo como con viriones ensamblados (Herbert *et al.*, 1996). La comparación de los extremos 5' de las secuencias de virus representativos de cada uno de los cuatro géneros y sus correspondientes secuencias internas repetidas sugiere que es una característica común a los calicivirus. La síntesis de un RNA subgenómico en células infectadas con calicivirus es una diferencia importante de la estrategia de replicación de los calicivirus y de los picornavirus, aunque varios de los enzimas replicativos presentan una homología distante (Green *et al.*, 2001). Las proteínas estructurales de calicivirus son expresadas como un mRNA subgenómico con dos cistrones solapantes. La primer ORF de este RNA codifica para la proteína mayoritaria de la cápside VP1 mientras que la segunda codifica para la proteína minoritaria de la cápside, VP2. La traducción de VP2 está mediada por un

mecanismo de terminación/iniciación, que depende de un elemento de secuencia aproximadamente de 50 nucleótidos aguas arriba de la región de unión al ribosoma (TURBS). Dos pequeños motivos de secuencia dentro de TURBS son esenciales para la reiniciación (Luttermann & Meyers 2009).

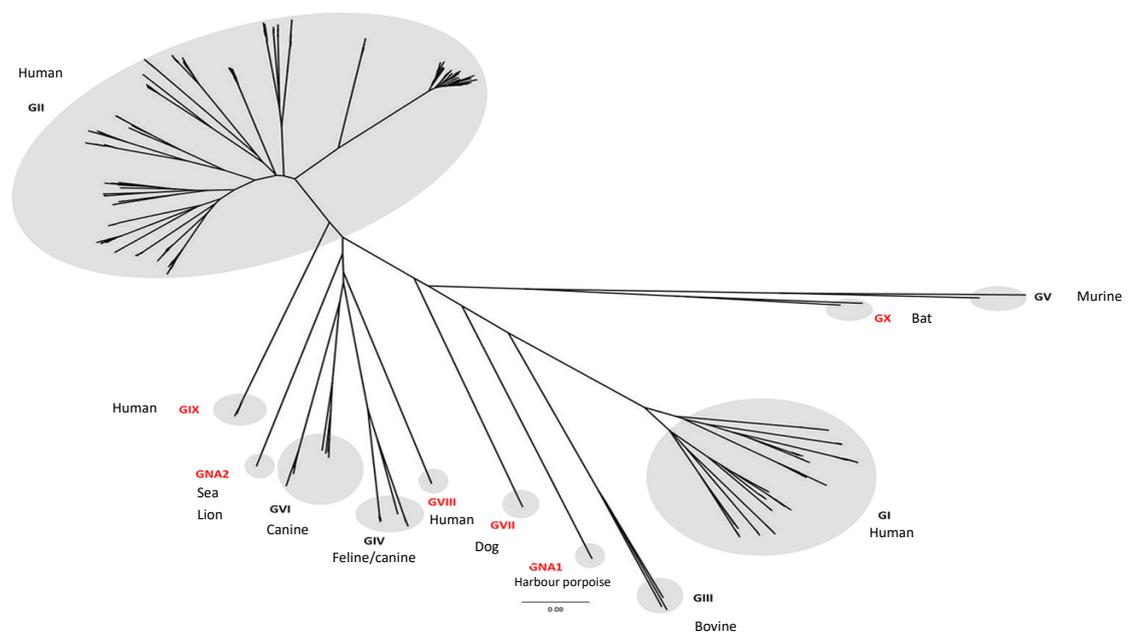
Mediante ensayos funcionales de la secuencia genómica 5' en el virus Jena, un norovirus bovino, se analizó la función IRES en la secuencia genómica en N-terminal en un sistema bicistrónico, pero no se obtuvo evidencia de actividad IRES (Salim *et al.*, 2008). Los alineamientos de secuencias proteicas N-terminales de varios norovirus mostraron una pequeña similitud entre genogrupos en los primeros 180 residuos, no obstante, en la región C-terminal de la proteína, la similitud entre aminoácidos se incrementa. Recientemente se han investigado las funciones de la proteína N-terminal de norovirus y se ha demostrado su interacción con el aparato de Golgi de las células infectadas (Fernandez-Vega *et al.*, 2004). Otros estudios sugieren que la proteína N-terminal de norovirus altera el tráfico intercelular de proteínas, incluyendo proteínas destinadas a la membrana de la célula huésped (Ettayebi & Hardy, 2003). Se describió un evento de escisión mediado por la proteasa 3C dentro de la proteína N-terminal (37 KDa) del virus Camberwell, un norovirus del genogrupo II que produce proteínas de 22 y 15 KDa (Seah *et al.*, 2003). En base a estas observaciones, se sugirió que la proteína N-terminal en norovirus corresponde a la región 2AB en picornavirus. Después de la expresión de proteínas estructurales de moléculas de RNA subgenómicas, la cápside se ensambla y el RNA viral es encapsidado antes de la liberación de los virus progenie (Asanaka *et al.*, 2005; Katayama *et al.*, 2006).

### 1.1.3. Diversidad molecular de norovirus

Los primeros estudios que analizaron la variabilidad de norovirus pronto mostraron que era importante distinguir entre cepas para comprender mejor su epidemiología. Dada la falta de herramientas para los análisis inmunológicos de las cepas de norovirus debido a la ausencia de sueros inmunes, la caracterización del genoma se realizó mediante el análisis de secuencias lo cual ha proporcionado un sistema provisional de genotipado (Desselberger & Gray, 2009). Como los genotipos suelen correlacionarse con los serotipos, la secuencia de aminoácidos de la proteína estructural mayoritaria (VP1) se ha utilizado para los análisis filogenéticos (Koopmans *et al.*, 2000). Los norovirus se clasifican en 10 genogrupos distintos (GI-GX) y se consideraba que sólo GI, GII y GIV eran capaces de infectar a humanos pero actualmente se sabe que GVIII y GX también pueden producir infecciones en humanos (Figura 4). Cada genogrupo contiene distintos genotipos, GI cuenta con 9 genotipos mientras que GII contiene 27 genotipos distintos. Los 10 genogrupos cuentan en total con más de 40 genotipos (Chhabra *et al.*, 2019).

Los genogrupos se definen en función de la diversidad aminoacídica de las 3 ORFs, las regiones codificantes de RdRp y VP1 o la región codificante de la VP1 sola. La clasificación en 10 genogrupos está basada en la divergencia de la proteína VP1 (Chhabra *et al.*, 2019). Los genotipos se definen en base a la secuencia de la polimerasa y de la cápside, asumiendo que el genotipo está determinado por una región del genoma que suele representar al genoma entero, debido a la naturaleza no segmentada del genoma de norovirus. Los nuevos genotipos se asignan cuando la secuencia aminoacídica de VP1 difiere en más de un 20% del resto de genotipos conocidos (Chhabra *et al.*, 2019). Sin embargo,

con la acumulación de más datos de secuencia, el umbral de corte se ha cambiado a 14.1% y a un mínimo del 15% de diferencia de aminoácidos entre el genotipo más próximo para la propuesta de un nuevo genotipo de norovirus (Kroneman *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2006).



**Figura 4.** Genogrupos y genotipos actuales de norovirus (Adaptado de Chhabra *et al.*, 2019).

Los eventos de recombinación normalmente ocurren entre la ORF1 y la ORF2, por lo que resulta necesario determinar tanto las secuencias de polimerasa como de cápside para describir las características genotípicas de las cepas clínicas (Buesa *et al.*, 2002; Bull *et al.*, 2007; Hoa Tran *et al.*, 2013). La recombinación es muy importante en estos virus ya que genera diversidad (Bull *et al.*, 2007). Un genotipado binario basado en la polimerasa y la secuencia aminoacídica de la cápside puede llevarse a cabo utilizando la herramienta “online” <http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool> (Kroneman *et al.*, 2011). Esta metodología emplea el porcentaje de similitud de bases en referencia a la cepa

prototipo. Por lo tanto, el genotipo de polimerasa se define con un valor de corte mayor o igual al 15% para la secuencia de nucleótidos de la polimerasa (aproximadamente 800 nucleótidos en el extremo 3' de la ORF1), al igual que el genotipo de cápside, que se define con un valor de corte mayor o igual del 15% para la secuencia de aminoácidos de la proteína principal de la cápside (VP1) (Vinjé *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2006). Con esto, se han descrito 14 genotipos GI y 29 genotipos GII dependientes de la polimerasa y 9 genotipos GI y 28 GII de la cápside (Chhabra *et al.*, 2019; Kroneman *et al.*, 2013). El genotipo GII.4 se subdivide en variantes (sub-genotipos) basados en la diversidad de secuencia (Vinjé *et al.*, 2004; Buesa & Rodríguez-Díaz, 2007; Siebenga *et al.*, 2007; Kroneman *et al.*, 2011). Las nuevas variantes de GII.4 se reconocen sólo después de proporcionar evidencia de que se han convertido en linajes epidémicos en al menos dos ubicaciones geográficamente distintas. La tabla 1 muestra la nueva nomenclatura propuesta para las variantes de norovirus GII (Chhabra *et al.*, 2019).

Denominación actual	Nueva denominación
GI.P6-GI.6	GI.6[P6]
GI.Pd-GI.3	GI.3[P13]
GII.P1-GII.1	GII.1[P1]
GII.P12-GII.3	GII.3[P12]
GII.pe-GII.4 Sydney	GII.4 Sydney [P31]
GII.P16-GII.4 Sydney	GII.4 Sydney [P16]
GII.4 New Orleans-GII.4 Sydney	GII.4 Sydney [P4 New Orleans]
GII.Pe-GII.17	GII.17[P31]
GII.P15-GII.15	GIX.1[P15]
GVI.P1-GIV.2	GIV.2[GVI.P1]

**Tabla 1.** Nomenclatura propuesta para las variantes de norovirus (Adaptado de Chhabra *et al.*, 2019).

La caracterización molecular sugiere que los calicivirus entéricos bovinos se deben incluir dentro de GIII, ya que este genogrupo contiene virus encontrados hasta ahora solo en bovinos (Ando *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2003; Smiley *et al.*, 2003). Análisis filogenéticos colocan al menos dos norovirus humanos dentro del genogrupo IV: las cepas Alpatron (GenBank: AF195847) y Ft Lauderdale (GenBank: AF414426) (Fankhauser *et al.*, 2002). Los norovirus porcinos se agrupan dentro del genogrupo II (Sugieda & Nakajima, 2002). El norovirus murino se incluye en el GV (GenBank: DQ285629), cuyos miembros están más cerca de GII que de GI mediante alineamientos de secuencia (Karst *et al.*, 2003). En la proteína de la cápside VP1, los norovirus humanos de un mismo genogrupo comparten al menos el 60% de identidad en la secuencia de aminoácidos, mientras que muchos genotipos del GI comparten menos del 50% de identidad con el genogrupo GII (Green *et al.*, 2001). Los serotipos de los picornavirus presentan generalmente >85% de identidad en la secuencia aminoacídica de la VP1, que está en el rango de corte para los genotipos de calicivirus (>80% de identidad de aminoácidos) (Oberste *et al.*, 1999).

Los calicivirus contienen regiones codificantes en RNA subgenómicos que se extienden desde el inicio del gen de la cápside hasta el extremo 3'. Se ha planteado la hipótesis de que el RNA subgenómico podría actuar como una unidad independiente que participa en los eventos de recombinación. Si la recombinación entre el RNA es un fenómeno común en los calicivirus, se puede esperar una elevada diversidad dentro de la familia, lo que facilitaría la emergencia de nuevas variantes y haría del genotipado una ardua tarea (Bull *et al.*, 2012). La recombinación permite a los calicivirus escapar del sistema inmune del huésped, de forma análoga a los cambios antigénicos producidos por el virus

de la gripe, pero mediante un mecanismo distinto. También se ha observado que la acumulación de mutaciones en el dominio P2 de la proteína de la cápside puede provocar cambios estructurales previstos, como la desaparición de una estructura helicoidal de la proteína y por lo tanto la aparición de nuevos fenotipos (Nilsson *et al.*, 2003; Lindesmith, Donaldson & Baric, 2011).

#### **1.1.4. Replicación**

Los estudios de replicación de los calicivirus humanos se han visto obstaculizados por la falta de un sistema de cultivo celular eficaz o un modelo animal apropiado. No obstante, recientemente se ha descrito el primer modelo de ratón para norovirus humano, que consiste en ratones BALB/c deficientes en el gen 1 o 2 que activa la recombinación (Rag) y la cadena gamma común ( $\gamma C$ ) (Rag<sup>-/-</sup>  $\gamma C$ <sup>-/-</sup> mice) (Taube *et al.*, 2013). La validación de este modelo podría acelerar la adquisición de nuevos conocimientos de la biología de los norovirus humanos y ayudar a investigar los mecanismos moleculares que regulan las infecciones por norovirus. Actualmente existe un modelo de cultivo celular de norovirus asociado a enteroides, con este se consigue replicar los norovirus del genotipo GII.4. Aunque se obtiene una concentración del virus bastante baja, proporciona una herramienta válida para el estudio de los norovirus humanos. La expresión de proteínas recombinantes de clones de cDNA permite generar mapas proteolíticos de las proteínas no estructurales de muchos calicivirus, por ejemplo del virus Southampton (un norovirus) y RHDV (un lagovirus) (Liu *et al.*, 1996). El análisis individual de proteínas recombinantes de estos calicivirus no cultivables ha permitido la identificación de las actividades NTPasa y de la 3C proteasa en el virus de la fiebre hemorrágica del conejo y en norovirus (Liu *et al.*,

1999) y de una RNA polimerasa RNA-dependiente en el virus de la fiebre hemorrágica del conejo. Estudios sobre los mecanismos de replicación de los calicivirus cultivables, como el calicivirus felino (FCV), han contribuido a entender mejor las características básicas de la replicación en calicivirus (Sosnovtsev *et al.*, 2003). El calicivirus felino replica produciendo dos tipos de RNAs poliadenilados, un RNA de aproximadamente 7.7 kb de polaridad positiva y un RNA subgenómico de 2.4 kb (Herbert *et al.*, 1996). El RNA genómico sirve como molde para la síntesis de proteínas no estructurales codificadas por la ORF 1, mientras que el RNA subgenómico actúa como molde para la traducción de proteínas estructurales.

Guix *et al.*, en 2007 demostraron que la transfección de RNA de Norwalk en células de hepatoma humano (Huh-7) mantiene la replicación viral con la consiguiente expresión de los antígenos virales, la replicación del RNA y la producción de partículas víricas al medio (Guix *et al.*, 2007). Si se trata previamente el RNA con proteinasa K se pierde la infectividad del RNA, lo que sugiere la necesidad de un complejo proteína-RNA. Sin embargo, se mantuvo un bloqueo a la propagación del virus a otras células en cultivo, lo que indica que el bloqueo existe tanto en la etapa de entrada como en la de salida de la célula (Guix *et al.*, 2007). Cierta número de factores del huésped son importantes para el ciclo replicativo de norovirus tal y como se ha demostrado por proteómica y genética reversa (Bailey *et al.*, 2010; Yunus *et al.*, 2010). Se ha visto que la proteína VPg interacciona con las proteínas de la célula huésped eIF4E e eIF4G (Chaudhry *et al.*, 2007). La estructura cristalográfica de las proteínas VPg del calicivirus felino y el norovirus murino se han determinado recientemente mediante espectroscopía de resonancia magnética (Leen *et al.*, 2013)

Los sistemas de genética reversa y replicones han sido herramientas muy importantes para dilucidar el mecanismo de replicación y patogenicidad de los calicivirus. Los sistemas de genética reversa están accesibles para virus cultivables como el calicivirus felino (Sosnovtsev *et al.*, 2003) el norovirus murino (Ward *et al.*, 2007), el calicivirus entérico porcino (Chang *et al.*, 2005), el virus de la fiebre hemorrágica del conejo (Liu *et al.*, 1999) y el virus Tulane, un calicivirus de mono Rhesus (Wei *et al.*, 2008). Para los calicivirus no cultivables, como los norovirus humanos, se han desarrollado sistemas de replicones con expresión transitoria o estable de RNA viral. La transfección de un clon de cDNA del RNA de longitud completa de virus Norwalk bajo el control del promotor T7 en células infectadas MVA-T7 permite la expresión de las proteínas víricas y la replicación del RNA de virus Norwalk (Asanaka *et al.*, 2005). Se generó un replicón basado en células para la replicación del virus Norwalk usando una secuencia consenso del cDNA clonado de su genoma (Fernandez-Vega *et al.*, 2004), diseñado para codificar el gen de resistencia a la neomicina como un marcador selectivo dentro de la ORF2. No obstante, solo algunas células transfectadas soportaban aparentemente la replicación del virus, lo que sugiere que las células presentan algunos factores de restricción a la replicación viral (Chang *et al.*, 2005).

#### **1.1.5. Interacciones virus-célula**

Se ha establecido que los calicivirus entéricos humanos y animales replican en el tracto intestinal superior, causando infecciones citolíticas en las vellosidades de los enterocitos pero no en los enterocitos de las criptas del intestino delgado. Las biopsias de yeyuno tomadas de voluntarios infectados experimentalmente que desarrollaron la enfermedad gastrointestinal después de la administración

oral de norovirus mostraron lesiones histopatológicas que consisten en acortamiento de las vellosidades, hiperplasia de células de la cripta, infiltración con células mononucleares y vacuolización citoplasmática (Dolin *et al.*, 1972). Experimentos con rVLPs de virus Norwalk y biopsias gastrointestinales humanas, mostraron que las VLPs se unen a las células epiteliales por la región pilórica del estómago y a los enterocitos en el duodeno. La unión de las rVLPs ocurre sólo en células, al igual que en saliva, de individuos que secretan antígenos histo-sanguíneos (HBGAs) (Marionneau *et al.*, 2002). Esto se determinó previamente en las uniones de los virus de la fiebre hemorrágica del conejos que se unen al grupo H tipo 2 de los HBGAs presentes en células epiteliales de conejo (Ruvoen-Clouet *et al.*, 2000). Se ha demostrado una unión significativa de las rVLPs a células Caco-2 diferenciadas (White *et al.*, 1997). Las células Caco-2 diferenciadas, derivadas de un individuo que exprese el grupo sanguíneo O, se asemejan a los enterocitos maduros y expresan el HBGA de tipo H en sus superficies celulares (Amano & Oshima, 1999).

Aunque los norovirus son altamente infecciosos (se ha estimado que entre 18 y 2800 viriones son suficientes para infectar a un adulto (Atmar *et al.*, 2014), estudios en voluntarios han demostrado que algunos sujetos no se infectan a pesar de haber sido inoculados con dosis altas del virus (Matsui & Greenberg, 2000). Esto puede deberse a la presencia de resistencia innata o bien a una inmunidad preexistente al virus (Lindesmith, 2003). Se ha asociado un mayor riesgo de infección por el virus Norwalk con el grupo sanguíneo O y las VLPs de virus Norwalk se unen a las células gastroduodenales de individuos que son secretores (Se<sup>+</sup>) pero no a los de los no secretores (Se<sup>-</sup>) (Hutson *et al.*, 2004; Marionneau *et al.*, 2002). El gen responsable del fenotipo secretor *FUT2* codifica

para una  $\alpha(1,2)$  fucosil-transferasa que produce los antígenos H encontrados en la superficie de células epiteliales y de secreciones mucosa (Lindesmith, 2003). Otras formas adicionales de HBGAs que se encuentran en la mucosa intestinal y en sus secreciones están en función de unas glicosil-transferasas adicionales, incluidas las que producen los antígenos Lewis (FUT3) y los antígenos de tipo A y B relacionados con los de los glóbulos rojos (Marionneau *et al.*, 2001). El descubrimiento de la unión de norovirus a las células del intestino de individuos que expresan carbohidratos HBGAs específicos determinados genéticamente, es un gran avance en la comprensión de las interacciones norovirus-huésped y la susceptibilidad a las infecciones por norovirus (Lindesmith, 2003; Hutson *et al.*, 2004). Individuos con el gen *FUT2* inactivo se llaman secretores-negativos, no expresan los carbohidratos HBGA necesarios para la unión de virus Norwalk, por ello muestran resistencia a la infección por este virus. Estos datos sostienen que *FUT2* y otros genes que codifican enzimas que regulan el procesamiento de los carbohidratos HBGAs, funcionan como alelos de susceptibilidad. Sin embargo, los individuos secretores negativos pueden infectarse con otras cepas de norovirus (Lindesmith *et al.*, 2008).

Para explorar el proceso por el que norovirus se une a las células se han utilizado las partículas pseudovíricas (VLPs), que mimetizan los viriones nativos tanto morfológicamente como antigénicamente (Allen *et al.*, 2008; Lindesmith 2003). El extremo C-terminal del dominio P de norovirus tiene la capacidad de autoensamblarse en partículas subvirales, llamadas partículas P (Tan & Jiang, 2005) las cuáles son potencialmente útiles para aplicaciones como el desarrollo de vacunas (Tan & Jiang, 2011). La región C-terminal (dominio P) de la proteína de la cápside está involucrada en la unión a los HBGAs y por ello juega un papel

importante en la infección (Marionneau *et al.*, 2002). Se han cristalizado las estructuras de unión a HBGA en virus Norwalk (GI.1) y VA387 (GII.4), cada uno de ellas representando los principales genogrupos de norovirus humanos (Choi *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2007). Las superficies de unión a HBGAs de las dos cepas difieren significativamente en sus estructuras, las ubicaciones exactas de la unión del HBGA y la composición aminoacídica, aunque ambas se ubican en la parte superior del dímero P (Tan *et al.*, 2009). El alineamiento de secuencias ha demostrado cuáles son los residuos responsables de la unión a los HBGAs y estos están altamente conservados dentro de un mismo genogrupo, pero no entre los genogrupos GI y GII. Las secuencias del subdominio P2 se mantienen altamente variables (Tan & Jiang, 2010). Se ha sugerido que los norovirus utilizan como receptores secundarios o alternativos otros distintos a los HBGAs cuando se unen a los enterocitos. Por lo tanto, los HBGAs podrían desempeñar un papel importante como co-receptores, por lo que bloquear estas interacciones puede no abolir la unión a las células (Murakami *et al.*, 2013).

Estudios recientes sugieren que los calicivirus animales pueden cruzar la barrera interespecie e infectar a humanos. La existencia hipotética de un reservorio animal y la posibilidad de la transmisión interespecie sugieren una relación filogenética entre los virus humanos y bovinos o porcinos dentro del género *Norovirus* (Lambden *et al.*, 1993; Dastjerdi *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Van Der Poel *et al.*, 2000). Sin embargo, la información sobre la frecuencia de transmisión entre especies de calicivirus es limitada. Dada la similitud genética de los calicivirus humanos y animales y su potencial de recombinación, es posible la transmisión entre especies de norovirus y de sapovirus aunque aún no se ha demostrado claramente.



## 1.2. Rotavirus

Los rotavirus son la principal causa de gastroenteritis vírica en niños menores de 5 años de todo el mundo y también en individuos jóvenes de una gran variedad de especies animales (Parashar *et al.*, 2006). Las infecciones por rotavirus en humanos ocurren a lo largo de toda la vida, pero la enfermedad suele ser leve o asintomática. Además de los casos esporádicos de gastroenteritis aguda, se han descrito algunos brotes de diarrea por rotavirus en niños en colegios y en adultos (Griffin *et al.*, 2002; Mikami *et al.*, 2004; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2008). Los rotavirus se descubrieron como causantes de gastroenteritis en humanos en 1973 (Bishop *et al.*, 1973; Flewett *et al.*, 1973; McNulty *et al.*, 1979). Son responsables de aproximadamente 240,000 muertes al año, principalmente en niños de países en vías de desarrollo (Tate *et al.*, 2016). La principal estrategia para combatir las infecciones por rotavirus ha sido el desarrollo de vacunas. Desde la década de los 80 este ha sido el centro de gran parte de la investigación sobre rotavirus, y, desde 2006, dos vacunas están siendo administradas en todo el mundo.

### 1.2.1 Clasificación de rotavirus

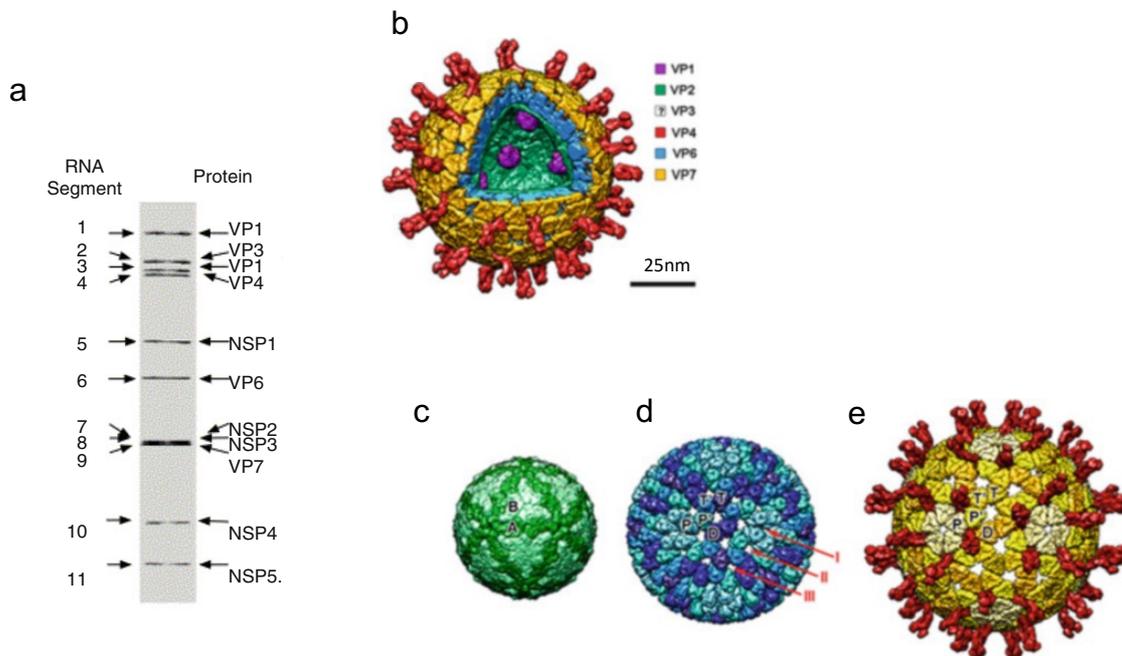
Clásicamente los rotavirus se han clasificado en función de su composición genómica y de la reactividad inmunológica de tres de sus proteínas estructurales, VP6, VP7 y VP4. Los rotavirus se clasifican en 8 genogrupos (A-H) en función de la reactividad inmunológica de la proteína de la cápside interna, VP6. Los rotavirus del grupo A están comúnmente asociados a infecciones en humanos. Dentro del grupo A, existen dos subgrupos (I y II) (Iturriza Gómara *et al.*, 2002). Las dos proteínas de la cápside externa, VP7 y VP4, sintetizan anticuerpos

neutralizantes y por ello se consideran implicadas en la protección frente a la infección. Utilizando estas dos proteínas se estableció un sistema de clasificación binario de rotavirus del grupo A en genotipos G (en función de la VP7 que es una glicoproteína) y P (de la VP4 que es sensible a proteasas) (Estes & Kapikian, 2007). Actualmente, se cuentan 36 genotipos G y 51 genotipos P entre humanos y animales, dependiendo de VP7 y VP4, respectivamente. Los serotipos G correlacionan completamente con los genotipos G como se ha determinado mediante los análisis de secuencia del gen VP7. No obstante, muchos genotipos P no correlacionan con el serotipo P (Estes & Kapikian, 2007). VP4 y VP7 están codificados por segmentos distintos de RNA (segmento 4 y segmentos 7-9, respectivamente), por lo que podemos encontrar varias combinaciones G y P tanto en animales como en humanos. Los genotipos G1P[8], G2P[4], G3P[8] y G4P[8] representan aproximadamente el 90 % de las cepas de rotavirus circulando en la mayoría de los países, además de otras combinaciones G y P que se están detectando de forma creciente (Iturriza-Gomara *et al.*, 2011). A parte de la clasificación binaria, se ha utilizado otro sistema que incluye el genotipo de la enterotoxina NSP4 (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2008). Recientemente el Grupo de Clasificación de Rotavirus (Rotavirus Classification Working Group, RCWG) ha establecido un nuevo sistema de clasificación utilizando el genoma completo (Matthijssens *et al.*, 2008; Matthijssens *et al.*, 2011). Esta clasificación nos permite entender mejor la diversidad genómica y antigénica de los rotavirus, así como los eventos de recombinación en las cepas de rotavirus. En esta clasificación genómica, cada uno de los 11 segmentos de RNA proporciona una denominación que incluye el genotipo G para VP7, P para VP4 y E para la proteína NSP4 (NSP4 es la

enterotoxina). El código de clasificación del genoma completo es el siguiente: Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx correlacionado con los genes VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 (Matthijnssens *et al.*, 2011). El análisis completo del genoma es interesante porque muestra las constelaciones genéticas y la compleja diversidad genética (Matthijnssens *et al.*, 2011). Basado en las comparaciones de secuencia del genoma completo de los rotavirus A se han establecido dos constelaciones no dependientes de G y de P; estas son I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 (tipo Wa) y I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 (tipo DS-1) que además se ha demostrado que están circulando por todo el mundo. La cepa de rotavirus Wa del grupo A se sugiere que es el ancestro común de las cepas de rotavirus del grupo A bovino (Matthijnssens *et al.*, 2008). Se estableció una tercera constelación de genotipo humano (aunque menor) denominada tipo AU-1 (I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3) que se originó en gatos o perros (Nakagomi *et al.*, 1990).

### **1.2.2. Estructura del virión**

La estructura en forma de rueda bajo el microscopio electrónico de transmisión es el rasgo característico de las partículas de rotavirus, y su nombre “rota” significa rueda en latín. Las partículas de rotavirus tienen simetría icosaédrica, y consisten en tres capas concéntricas de proteínas, con un diámetro de ~1000 Å incluyendo las espículas (Estes & Kapikian, 2007). La capa interna está formada por la proteína VP2 que rodea completamente los 11 segmentos de RNA genómico, y las proteínas VP1 y VP3 que forman un complejo heterodimérico en la superficie interior de la VP2, actuando como enzimas de transcripción (Prasad *et al.*, 1996) (Figura 4).



**Figura 4.** Características estructurales de rotavirus. **a** SDS-PAGE de los 11 segmentos de doble cadena de RNA (dsRNA) que componen el genoma de rotavirus; a la izquierda se indica el segmento mientras que a la derecha la proteína para la que codifica. **b** Reconstrucción de la partícula vírica de rotavirus mediante un modelo atómico. Se indica el código de colores, excepto para la VP3 que no está localizada en el modelo. Las espículas proteicas, VP4, están en rojo mientras que la capa más externa, VP7, se identifica en amarillo. La escala corresponde a 25 nm. **c** Vista de la estructura interna de la partícula, se muestra la capa más interna VP2 (VP2-A y VP2-B) indicados en diferentes niveles de verde. **d.** Estructura de la cápside intermedia, VP6 indicado en azul. **e.** Estructura de la capa externa. Las 60 espículas de VP4 se muestran en rojo. (Modificado de Rodríguez & Luque, 2019).

La VP1, RNA polimerasa RNA dependiente, interactúa con la VP3, la proteína con actividad guaniltransferasa y metilasa (Liu, Mattion & Estes, 1992). 120 copias de VP2 (proteína de unión a RNA) conforman la estructura interna o “core” (Labbé *et al.*, 1991). La adición de VP6 a la capa de VP2 produce las partículas de doble capa (DLPs). VP6 forma 260 trímeros interrumpidos por 132 canales acuosos de tres tipos diferentes en relación con la simetría de la cápside. La capa más externa de la partícula de triple capa (TLP) está formada por dos proteínas, VP7 y VP4. La superficie lisa del virus está conformada por 260

trímeros de VP7 y 60 espículas que emergen de la superficie del virus y que consisten en dímeros VP4 (Prasad *et al.*, 1998; Yeager *et al.*, 1990). Las DLPs y las TLPs de rotavirus contienen 132 canales que les permiten intercambiar componentes del interior con el exterior de la partícula vírica. Hay 12 tipos de canales tipo I, cada uno localizado en uno de los vértices de la TLP y de la DLP. Cada uno de los canales tipo I está rodeado por cinco canales de tipo II y 60 canales de tipo III que se sitúan en las posiciones hexavalentes adyacentes al triple eje icosaédrico (Yeager *et al.*, 1990).

Durante la entrada en la célula la TLP pierde las proteínas VP7 y VP4, y como resultado aparece la DLP transcripcionalmente activa dentro del citoplasma (Estes & Kapikian, 2007). VP4 es una proteína no glicosidada de 776 aminoácidos que presenta funciones esenciales en el ciclo celular del virus, incluyendo la unión al receptor, la penetración celular, la actividad de hemaglutinina y la modificación de la permeabilidad celular de las membranas (Estes & Kapikian, 2007). VP4 se escinde proteolíticamente dando lugar a las subunidades VP5\* y VP8\*, esta escisión de VP4 aumenta la infectividad del virus. Se ha demostrado que la escisión por tripsina promueve un cambio en las espículas de VP4, que es esencial para que el virus ingrese en la célula (Crawford *et al.*, 2001). Además, estudios bioquímicos con VP4 recombinantes muestran que la proteólisis de monómeros de VP4 genera dímeros de VP5\* (Dormitzer *et al.*, 2002). Se ha demostrado por tomografía crioelectrónica que la digestión proteolítica de VP4 induce en ella cambios conformacionales que permiten la entrada del virus en la célula (Rodríguez *et al.*, 2014). VP7 es una glicoproteína de unión al calcio compuesta por 326 aminoácidos con 9 regiones variables que contribuyen a su especificidad funcional y antigénica (Nishikawa *et*

*et al.*, 1989). Además, la VP7 interacciona con las integrinas  $\alpha\beta 2$  y  $\alpha\beta 4$  (Coulson *et al.*, 1997; Hewish *et al.*, 2000) e induce la activación de células B intestinales durante la infección por rotavirus (Blutt *et al.*, 2004).

Cuando la DLP se localiza intracelularmente, se vuelve activa transcripcionalmente y los nuevos transcritos de mRNA son translocados de la partícula a través de los canales tipo I (Lawton *et al.*, 1997). Prasad *et al.*, 1998 fueron los primeros en proponer que estos canales en la capa de VP6 podrían ser utilizados para exportar los mRNA. Estudios de microscopía electrónica han confirmado que las DLPs mantienen la integridad de su estructura durante el proceso de transcripción. Mediante un modelo pseudoatómico de VP6 con una estructura T=13 (Mathieu *et al.*, 2001) se descubrió un motivo de VP6 de hojas  $\beta$  con una secuencia altamente conservada, que sobresale en el canal de salida del mRNA. Esta puede desempeñar un papel funcional muy importante en la translocación de transcritos nacientes (Lawton *et al.*, 1997). El análisis detallado de las mutaciones en la capa de VP6 han contribuido a dilucidar los determinantes de VP6 necesarios para su ensamblaje con VP2 y cómo VP6 puede afectar a la transcripción (Charpilienne *et al.*, 2002).

### **1.2.3. Genoma**

El genoma de rotavirus está compuesto por 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA) con extremos 5' y 3' conservados, con tamaños que varían de 667 pb (segmento 11) hasta 3302 pb (segmento 1). La cepa de rotavirus de simio SA11 tiene 6120 KDa y sus genes codifican para seis proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7) y 6 proteínas no estructurales (NSP1-NSP6). La nomenclatura, función y muchas otras propiedades de las proteínas

codificadas en los 11 segmentos, están bien establecidas. La tabla 2 muestra cada una de estas proteínas y sus características más relevantes. La asignación de proteínas se determinó mediante la traducción de mRNA *in vitro* o dobles cadenas de RNA desnaturalizadas y por análisis de virus recombinados (Estes & Kapikian, 2007).

Tamaño del segmento genómico (pb)	ORFs	Producto génico	Tamaño proteico aa	Localización en la partícula vírica	Número de copias/partícula	Funciones
1 (3302)	18-3282	VP1	1088	Cápside interna	12	-RNA polimerasa RNA dependiente -Complejo de replicación - Enlace de 3'-mRNA específico del virus - Pieza de complejo de transcripción del virion con VP3
2 (2690)	17-2659	VP2	881	Cápside interna	120	-Proteína del núcleo -Actividad de unión no específica al ss y dsRNA -Parte mínima del complejo de replicación -Actividad de ensamblaje y unión al RNA
3 (2591)	50-2554	VP3	835	Cápside interna	12	-Enzima multifuncional guaniltransferasa y metiltransferasa -Localizada en los vértices del core -Parte del complejo de replicación con VP1 -Unión no específica al ssRNA
4 (2362)	10-2337	VP4	776	Cápside externa (espículas)	120	-Espículas de la cápside externa -Interactúa con VP6 -Su digestión con tripsina mejora la infectividad -Proteína de unión a las células -Antígenos tipo P
	-	VP5*	529			
	-	VP8*	247			
5 (1611)	31-1515	NSP1	495	No estructural	-	-Asociada con el citoesqueleto -Unión al extremo 5'-mRNA -Interactúa con el IFN 3.
6 (1356)	24-1214	VP6	397	Cápside intermedia	780	-Proteína mayoritaria del virión -Cápside media -Antígeno de subgrupo
7 (1105)	26-970	NSP3	315	No estructural	-	-Unión específica al extremo 3'-mRNA -Unión al factor de iniciación eIF4G1 -Implicado en la regulación traduccional
8 (1059)	47-997	NSP2	317	No estructural	-	-NTPasa -Unión no específica al ssRNA -implicado en la formación del viroplasma con NSP5
9 (1062)	49-1026	VP7	326	Glicoproteína de la cápside externa	780	-Glicoproteína estructural de la cápside externa - Antígenos tipo G
10 (751)	41-569	NSP4	175	No estructural	-	-Enterotoxina -Receptor para la formación de la partícula doble a través de la membrana del retículo rugoso -Movilización del Ca <sup>2+</sup> en las células del huésped -Asociado a patogenicidad
11 (667)	22-615	NSP5	198	No estructural	-	-Interactúa con VP2, NSP2 y NSP6 -Unión no específica al ssRNA
	80-355	NSP6	92	No estructural	-	-Interacciona con NSP5 -Producto secundario de la ORF -Se localiza en el viroplasma

**Tabla 2.** Segmentos del genoma y proteínas del rotavirus SA11 de simio: asignaciones de codificación, funciones y propiedades biológicas de las proteínas codificadas [adaptado de Estes (2001) y Estes y Kapikian (2007)].

Los análisis por criomicroscopía electrónica han permitido observar la organización estructural del genoma vírico ( Prasad *et al.*, 1996) y muestran que la doble cadena de RNA forma una estructura dodecaédrica en la cual las dobles hélices del RNA interaccionan estrechamente con la VP2 de la capa interna, y

que se agrupan alrededor de los complejos de transcripción ubicados en los vértices icosaédricos. La VP2 tiene propiedades de unión a RNA, puede ser la responsable del ordenamiento icosaédrico y de las porciones de RNA que interactúan estrechamente. Pesavento *et al.*, (2001) demostraron que el genoma de rotavirus puede expandirse o condensarse bajo ciertas condiciones químicas dentro de la cápside ( Pesavento *et al.*, 2001). Esta condensación es concéntrica respecto a la partícula central y una masa oscura de elevada densidad se mantiene de forma consistente en el centro de cada una de las partículas (Pesavento *et al.*, 2001). Un pH alto en presencia de iones de amonio provoca la condensación del genoma hasta un radio de 180 Å, siendo el inicial de 220 Å. Cuando se vuelve a las condiciones de pH fisiológicas, el genoma se expande hasta su radio original (Pesavento *et al.*, 2001). Estos estudios sugieren que VP2, a través de sus propiedades de unión al RNA muestra una importante función manteniendo el espacio entre las cadenas de RNA en su situación expandida. Un modelo de organización estructural del genoma que surge de estos estudios es que cada segmento de dsRNA se enrolla alrededor de un complejo de enzimas de transcripción en los cinco ejes, dentro de la capa más interna de la cápside (Prasad *et al.*, 1996; Pesavento *et al.*, 2001; Pesavento *et al.*, 2003).

#### **1.2.4. Mecanismos de evolución y diversidad**

Los rotavirus, como muchos otros virus de RNA, tienen un elevado grado de diversidad. Además de los diferentes genotipos G y P y de una gran variedad de combinaciones de estos, también tienen variaciones intratípicas. Tres mecanismos, juntos o de forma aislada, son importantes para la evolución y diversidad de los rotavirus:

- (a) Deriva antigénica: la tasa de mutación en los genes de rotavirus es relativamente alta, ya que la replicación del RNA lleva asociados muchos errores. La tasa de mutación por replicación se ha calculado que es  $<5 \times 10^{-5}$  por nucleótido, lo que implica que como media un genoma de rotavirus difiere del genoma parental en al menos una mutación (Blackhall *et al.*, 1996). Pueden acumularse mutaciones puntuales y dar lugar a variaciones intratípicas, como se identifica por la existencia de distintos linajes dentro de los genes VP7 y VP4. Las mutaciones puntuales pueden contribuir también a cambios antigénicos que darán lugar a mutantes con capacidad de evadir al sistema inmunitario (Estes & Kapikian, 2007; Iturriza-Gómara *et al.*, 2011).
- (b) Cambios antigénicos: el intercambio de segmentos génicos a través de la recombinación puede ocurrir durante una infección mixta en una única célula. Los reordenamientos pueden contribuir a la diversidad de los rotavirus y además esto es evidente en reordenamientos acontecidos *in vitro* (Raming 2000). Hay evidencias también de que el reordenamiento a través de alteraciones en las interacciones proteína-proteína posibilitan la aparición de cambios conformacionales en los epítomos, lo que favorece la evolución de tipos antigénicos (Chen *et al.*, 1992; Lazdins *et al.*, 1995). La transmisión interespecífica y la subsecuente recombinación tienen gran importancia al incrementar la diversidad de los rotavirus co-circulantes. Además, los genes de rotavirus humanos pueden codificar proteínas desconocidas inmunológicamente para la población humana, lo que puede permitir una rápida propagación de la cepa recombinante (Iturriza-Gómara *et al.*, 2000). Mientras los cambios antigénicos siempre

se consideran las mayores fuerzas de evolución, el análisis de secuencias del genoma completo revela que hay restricciones en este mecanismo de evolución.

- (c) Reordenamientos génicos: la concatemerización o la aparición de segmentos genómicos truncados contribuyen de forma importante a la evolución de rotavirus a través de la producción de nuevas proteínas con funciones alteradas (Servin, 2003).

### **1.2.5. Replicación del genoma**

La actividad RNA polimerasa de las DLPs cataliza la síntesis de los 11 segmentos de mRNA de rotavirus, que comprenden tamaños entre 0.7 y 3.3 kb (Estes & Kapikian, 2007). El transcrito naciente es extraído a través de los canales presentes en los ejes de simetría quintuple de las DLPs (Lawton *et al.*, 1997). Los extremos 5'- y 3'- no traducidos (UTRs) tienen una longitud entre 9-49 y 17-182 nucleótidos respectivamente. Los mRNAs virales sirven como molde para la síntesis de las cadenas de RNA negativas, para formar las moléculas de dsRNA (Chen *et al.*, 1994). La síntesis del dsRNA y su ensamblaje dentro de las DLPs ocurre en los viroplasmos del citoplasma (Estes & Kapikian, 2007). Existen tres especies de RNA que contienen replicones intermedios (RI) en las células infectadas: el replicón intermedio pre-núcleo, que contiene las proteínas estructurales VP1 y VP3; el replicón intermedio "core" con VP1, VP2 y VP3 y la doble capa del replicón intermedio que contiene VP1, VP2, VP3 y VP6. Los 11 segmentos genómicos son producidos y empaquetados en cantidades equimolares en las células infectadas por rotavirus, lo que demuestra que tanto el embalaje del RNA como su replicación son procesos coordinados (Patton &

Gallegos, 1990). La ausencia de un dsRNA desnudo en las células infectadas sugiere que el empaquetado del RNA se produce después de la replicación (Patton *et al.*, 2003)

Las únicas secuencias que están conservadas dentro de los mRNAs de rotavirus se encuentran en las UTRs. Como los 11 segmentos de mRNA se replican por el mismo complejo polimerasa VP1-VP2-VP3, los mRNAs del virus comparten señales comunes de reconocimiento de la polimerasa (Patton *et al.*, 2003). La característica más destacable es que en el extremo 3' de los mRNAs de rotavirus, al igual que en otros miembros de la familia *Reoviridae*, hay ausencia de una cola poli-(A). En vez de esto, todos los genes y mRNAs en sus extremos tienen una secuencia conservada (UGACC) en todos los segmentos de los rotavirus del grupo A. Los estudios de mutagénesis dirigida han revelado que es el 3'-CC de la secuencia consenso el más crítico para la síntesis de la cadena negativa (Chen *et al.*, 2001). Además, se ha demostrado que el promotor para la síntesis de la cadena negativa se forma mediante el emparejamiento de bases en cis de secuencias complementarias próximas a los extremos 5'- y 3'- de los mRNAs (Chen & Patton, 1998). La secuencia consenso en 3'- contiene una señal en cis que actúa como potenciador de la traducción, cuya actividad está mediada por NSP3, que reconoce específicamente los cuatro o cinco últimos nucleótidos de la secuencia 3' consenso (Poncet *et al.*, 1994). La NSP3 a su tiempo interacciona con el factor de iniciación, eIF4GI, y facilita la circularización del mRNA en polisomas, lo que incrementa la eficiencia de la expresión génica viral (Piron *et al.*, 1998).

El desarrollo de un sistema celular que permita la síntesis del dsRNA a partir de un mRNA exógeno supone un gran hito en el estudio de la replicación de

rotavirus, además proporciona una herramienta para analizar los elementos en el mRNA vírico que promueven la síntesis de la cadena negativa. Este sistema está basado en núcleos derivados de viriones que han sido “interrumpidos” o “abiertos” mediante un tampón hipotónico (Chen *et al.*, 1994). Históricamente, han surgido dos sistemas que permitían la genética reversa parcial en rotavirus. La primera aproximación utilizó un virus “helper” y se seleccionaron los anticuerpos neutralizantes (Komoto *et al.*, 2008; Komoto *et al.*, 2006). Sin embargo, en esta aproximación sólo las proteínas estructurales fueron capaces de generar anticuerpos neutralizantes. En la segunda aproximación, la combinación de una NSP2 defectuosa con un RNA de interferencia que mediaba la degradación de los mRNA de la NSP2 permitió la doble selección y recuperación de virus recombinantes con modificaciones en genes codificantes para proteínas no estructurales (Navarro *et al.*, 2013; Trask *et al.*, 2010). Pero no fue hasta el año 2017 cuando Kanai y colaboradores diseñaron un sistema de genética reversa para los rotavirus (Kanai *et al.*, 2017).

### **1.2.6 Infección celular**

Los rotavirus tienen un tropismo específico *in vivo*, ya que infectan inicialmente los enterocitos maduros de las microvellosidades del intestino delgado. Muchos estudios sugieren que la propagación extra-intestinal del virus tiene lugar durante la infección, lo que indica un tropismo más amplio de lo que inicialmente se consideraba (Blutt *et al.*, 2003; Mossel & Ramig, 2003). Los rotavirus pueden unirse a una gran variedad de líneas celulares, aunque sólo unas cuantas son infectadas de forma eficiente. Estas incluyen células de origen renal e intestinal y líneas celulares transformadas de mama, estómago, pulmón y osteocitos (

Ciarlet *et al.*, 2002). Muchos estudios de replicación de rotavirus se han realizado en células MA104, las cuáles se utilizan de rutina para producir la progenie del virus. No obstante, nuevas investigaciones en los mecanismos patológicos de la infección por rotavirus se están realizando utilizando células polarizadas *in vitro* de intestino humano HT-29 y Caco-2 (Servin, 2003).

Los rotavirus entran en las células mediante un proceso muy complejo en el que diferentes dominios de la superficie viral interaccionan con moléculas de la superficie celular que actúan como receptores (Guerrero *et al.*, 2002; Ciarlet *et al.*, 2002; Ciarlet & Estes 2001; López & Arias 2004). Muchas cepas de rotavirus animales reconocen residuos de ácido siálico (SA) para unirse a la superficie celular y mejorar su infectividad que disminuye mediante el tratamiento de las células con neuraminidasa (NA). Por el contrario, muchas cepas animales y humanas son NA resistentes (Ciarlet & Estes, 1999). Las interacciones de rotavirus con el SA son dependientes del genotipo VP4 de cada virus y no del origen de las cepas (Ciarlet *et al.*, 2002). VP8\* es el dominio de VP4 involucrado en las interacciones con el ácido siálico, mientras que VP5 está implicado en las interacciones con las integrinas. La interacción de los rotavirus con las integrinas  $\alpha 2\beta 1$  se ha demostrado que está mediada por el dominio DGE de reconocimiento de integrinas, localizado en los aminoácidos 308-310 de la VP4, en la región de VP5\*. VP4 también contiene el tripéptido IDA, en los aminoácidos 538-540 que es un motivo de unión a ligando para la integrina  $\alpha 4\beta 1$  (Coulson *et al.*, 1997); sin embargo, la funcionalidad de este sitio no ha sido demostrada. También se ha demostrado que la integrina  $\alpha v\beta 3$  está involucrada en la entrada celular de varias cepas de rotavirus en un paso posterior a la unión (Graham *et al.*, 2003).

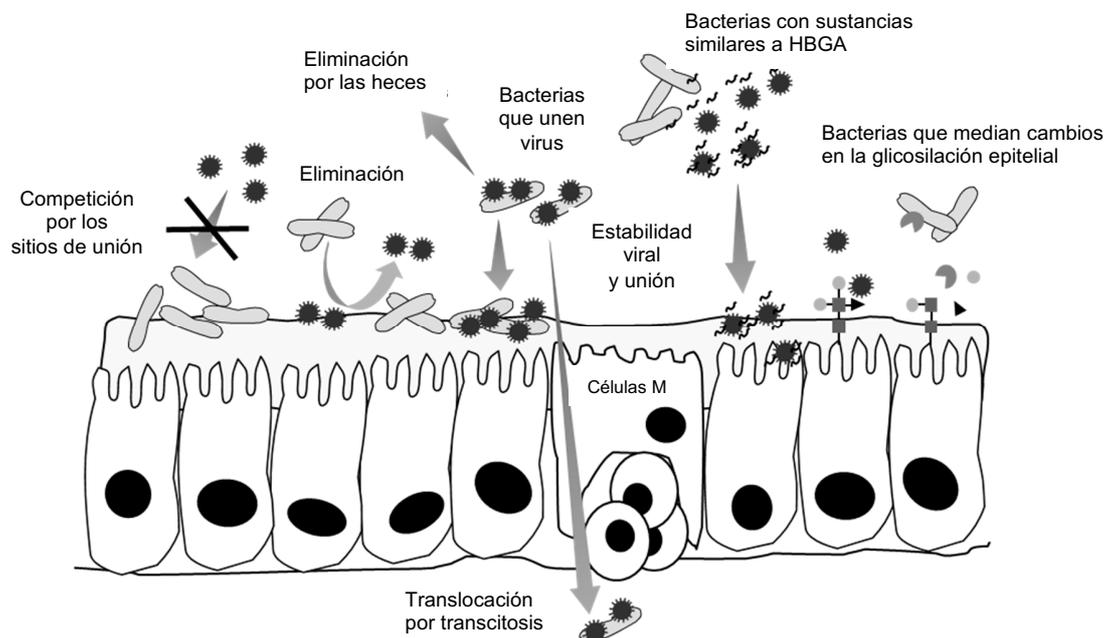
Además, la proteína de choque térmico de la superficie celular, hsc70, también actúa como receptor posterior a la unión para cepas de rotavirus sensibles y resistentes a NA (Guerrero *et al.*, 2002). Los estudios con líneas celulares epiteliales polarizadas muestran que la entrada viral de cepas dependientes de SA está restringida a la membrana apical, mientras que las cepas independientes de SA ingresan apical o basolateralmente (Ciarlet & Estes, 2001). Se ha sugerido que las balsas lipídicas podrían desempeñar un papel en la entrada celular de rotavirus (Isa *et al.*, 2004), probablemente sirviendo como plataformas para permitir una interacción eficiente de los receptores celulares con la partícula viral (López & Arias, 2004).

Recientemente se ha demostrado que los HBGAs pueden actuar como receptores o co-receptores para ciertos genotipos de la proteína VP4 (Huang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012; Ramani *et al.*, 2013). Estos hallazgos son relevantes desde el punto de vista de la genética del huésped, porque las poblaciones con una alta prevalencia de un genotipo Lewis negativo son insensibles a los rotavirus de genotipos VP4 P[8], disminuyendo así la circulación de los genotipos P[8] y reduciendo la eficacia de las vacunas contra rotavirus del genotipo P[8]. La infección por rotavirus en células Caco-2 polarizadas y completamente diferenciadas produce un descenso en la expresión de hidrolasas en el borde de las microvellosidades (Jourdan *et al.*, 1998). La actividad sacarosa-isomaltasa y su expresión apical se reducen específicamente en la infección por rotavirus sin ninguna destrucción celular aparente (Jourdan *et al.*, 1998). Además, la infección viral induce un aumento en la concentración de calcio intracelular, que daña el citoesqueleto microvillar y promueve lesiones estructurales y funcionales en las

uniones estrechas de los complejos de unión de células en monocapas de Caco-2 sin dañar su integridad (Brunet *et al.*, 2000; Obert *et al.*, 2000).

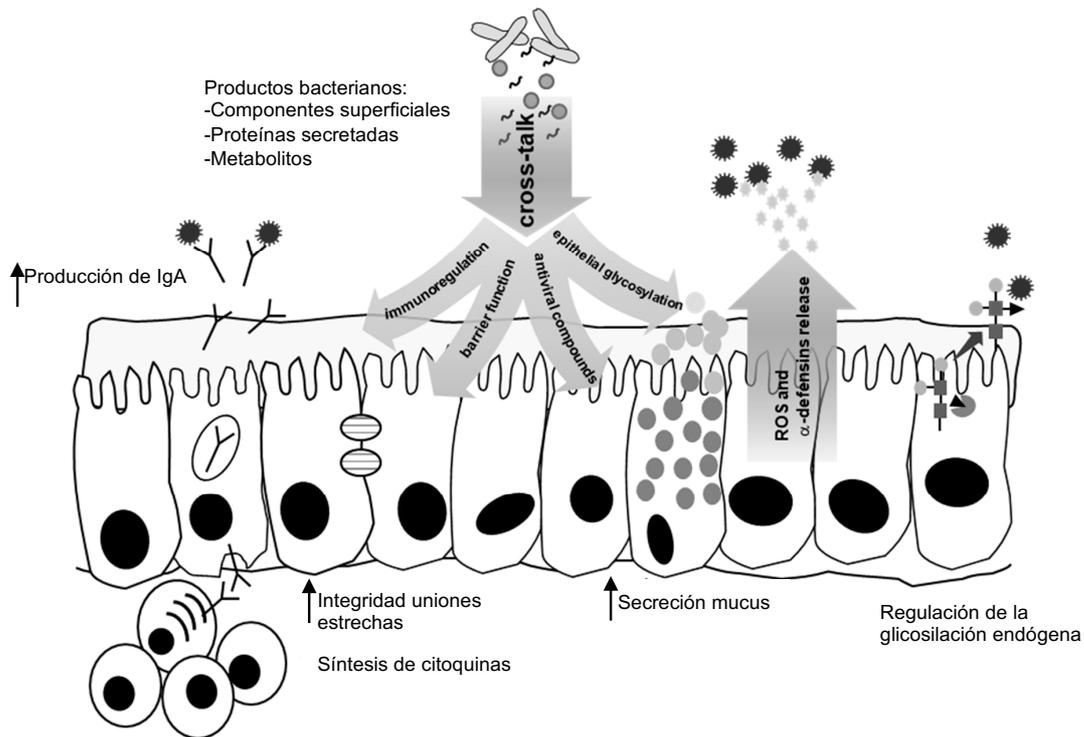
### 1.2.7. Microbiota intestinal y susceptibilidad a las infecciones por rotavirus y norovirus

Los probióticos intestinales como *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium lactis* Bb-12 o la levadura *Saccharomyces boulardii*, entre otros, se han estudiado a fondo por sus efectos beneficiosos sobre la incidencia y la gravedad de la diarrea viral (Monedero, Buesa & Rodríguez-Díaz, 2018). Las interacciones físicas de bacterias con rotavirus y norovirus y con componentes de la superficie de la mucosa que son objetivos para la unión viral, han sido propuestas como mecanismos para el bloqueo físico de la unión del virus (Figura 5).



**Figura 5.** Interacciones propuestas de bacterias intestinales comensales con virus entéricos y sus efectos sobre la accesibilidad viral. Las interacciones físicas de bacterias con virus entéricos pueden promover o bloquear la infectividad viral. La unión de partículas virales por bacterias puede promover su eliminación en las heces, estimular su unión a la mucosa o su transcitosis. Alternativamente, las bacterias pueden bloquear los sitios de unión viral o modificar el estado de glicosilación de la mucosa, lo que a su vez afecta a la unión viral según Monedero *et al.*, 2008.

Además, la inmunorregulación y el refuerzo de la barrera intestinal como consecuencia del “cross-talk” que se establece entre las bacterias comensales probióticas y las células epiteliales e inmunes han surgido como un mecanismo principal que media los efectos antivirales de la microbiota (Figura 6).



**Figura 6.** Efectos sobre la infectividad viral. Las bacterias producen diversas moléculas que participan en “cross-talk” con células epiteliales o inmunes. Esto desencadena diversos mecanismos que afectan la infectividad viral. La inmunorregulación (producción de IgA específica, citocinas como IFN- $\gamma$  o IFN- $\beta$  o regulación de poblaciones de linfocitos) provocada por bacterias puede limitar la infección viral. El cross-talk entre células y bacterias mejora la función de barrera e induce la síntesis de moléculas que pueden reducir la infectividad: mucinas, especies reactivas de oxígeno (ROS) o ciertas defensinas. Al mismo tiempo, la glicosilación de la mucosa del huésped está regulada por la microbiota endógena según Monedero *et al.*, 2008.

También se ha descrito que la secreción de moléculas que interfieren con los virus, como el aumento de la producción de moco o la síntesis de compuestos antivirales potenciales (por ejemplo, especies reactivas de oxígeno y algún tipo de defensinas) está regulada por la microbiota entérica (Figura 5) y se sabe que el estado de glicosilación de la mucosa intestinal puede verse influenciada por

microorganismos comensales (Freitas *et al.*, 2005). Las bacterias probióticas (*L. rhamnosus* GG y *B. lactis* Bb-12) pueden unir rotavirus en su superficie (la cepa de rotavirus bovino NCDV y la cepa humana Wa) a diferentes niveles y esto se ha propuesto como una forma de interferir con la infección viral secuestrando partículas virales y promoviendo su eliminación a través de las heces. Los experimentos con norovirus humanos (genotipos GII.3, GII.4, GII.6 y GII.7) lo han demostrado también con la enterobacteria *Enterobacter* sp. La cepa SENG-6 de *Enterobacter* sp. puede unir las partículas virales en su superficie debido a la presencia de moléculas similares a HBGAs de los tipos A, B y H que forman parte de polímeros secretados extracelularmente (Miura *et al.*, 2013). Las partículas P de los genotipos GI.1 y GII.4 de norovirus también mostraron su capacidad para interactuar con la superficie de las bacterias comensales y probióticas Gram-positivas y Gram-negativas (Rubio-del-Campo *et al.*, 2014). La unión de rVLPs de norovirus humanos (GI.6 y GII.4) se ha evidenciado en cepas intestinales humanas de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Hafnia* (Almand *et al.*, 2017). Al analizar el efecto de la interacción bacteria/virus en la unión a células cultivadas mediante el uso del modelo de partículas P de norovirus humano, se observó que la incubación conjunta de partículas P de genotipo GI.1 con bacterias disminuyó su unión a las células HT-29. Por el contrario, los experimentos de exclusión o desplazamiento de partículas P de norovirus humano por las bacterias dieron como resultado un aumento de la unión de las partículas subvirales a las células en cultivo (aumento de hasta un 400%) (Rubio-del-Campo *et al.*, 2014). Esto coincide con la observación de que algunos probióticos mejoraban la unión de los patógenos bacterianos a las células cultivadas (Rinkinen *et al.*, 2003) y sugiere que, en

algunos casos, la unión a la superficie bacteriana del norovirus humano puede estar promoviendo la infección viral en lugar de limitarla. De forma contraria al papel aceptado de la microbiota comensal intestinal y bacterias particulares (probióticos) como línea de defensa contra los patógenos entéricos (resistencia a la colonización), la microbiota ha aparecido recientemente como un tercer actor en la infectividad viral. Se obtuvieron pruebas preliminares sobre el papel de la microbiota intestinal en la replicación de virus en mamíferos mediante el uso de modelos de ratones con microbiota intestinal eliminada (ratones o animales libres de microorganismos tratados con cócteles de antibióticos) y virus que no atacan el tracto gastrointestinal o no causan gastroenteritis. El virus del tumor mamario murino (MMTV) utiliza la microbiota para evadir al sistema inmunitario haciendo uso de un mecanismo que induce tolerancia a la microbiota residente. Se descubrió que los viriones de MMTV interactúan con el lipopolisacárido bacteriano (LPS), lo que desencadena una respuesta mediada por TLR4 que resulta en inmunosupresión (Kane *et al.*, 2011). La leucemia inducida por el virus de la leucemia murina (MuLV) disminuyó en animales libres de microorganismos y se planteó la hipótesis de que la microbiota estimulaba el aumento de las células linfoides, que son la diana de MuLV. Similar a MMTV, se vio que el poliovirus de replicación intestinal se une al polisacárido del LPS, lo que da como resultado una mayor estabilidad al calor y capacidad de unirse al receptor de poliovirus en ratones transgénicos (Kuss *et al.*, 2011). Como consecuencia, la infectividad se redujo en ratones libres de microorganismos o tratados con antibióticos. Se observó el mismo efecto para el reovirus entérico T3SA+, que pertenece a la misma familia que rotavirus, lo que sugiere que éste puede ser un fenómeno extendido en otros virus entéricos (Kuss *et al.*, 2011). Un trabajo

reciente que empleó una batería de microorganismos intestinales de Gram-positivos y Gram-negativos (36 cepas bacterianas) demostró que la mayoría de ellos tenían capacidad de unirse a poliovirus (Erickson *et al.*, 2018). El mayor porcentaje de unión se encontró para *Lactobacillus johnsonii* FI9785 (un aislado de aves de corral), mientras que el mayor aumento de la infección por poliovirus en células HeLa se observó después de la incubación conjunta con aislados fecales humanos de *Lactobacillus johnsonii*. Aunque algunas cepas aumentaron la infección viral, este incremento no se correlacionó con su capacidad de unirse al poliovirus. Por el contrario, la infección por poliovirus se relacionó con la capacidad de las bacterias para unirse a las células huésped HeLa (Erickson *et al.*, 2018). Se encontró una situación análoga al analizar las partículas P de norovirus humano que se unen a las células HT-29, donde *Lactobacillus casei* BL23 y *E. coli* Nissle 1917, dos cepas que se unen a la superficie HT-29, promovieron la retención de partículas P en las superficies celulares (Rubio-del-Campo *et al.*, 2014). Durante los últimos años también se han obtenido evidencias del papel positivo de la microbiota en la infectividad de rotavirus y norovirus. Si bien varios tipos celulares son susceptibles a la infección por rotavirus *in vitro*, para los norovirus humanos no fue hasta hace poco que se describió la replicación *in vitro* en linfocitos B humanos (Jones *et al.*, 2015). Esta infección *in vitro* requirió de microbiota intestinal, como se evidenció cuando la infección se realizó con inóculos norovirus humano (GII.4, aislado de heces) que no se filtraron para eliminar las bacterias acompañantes. Se observó que bacterias específicas como *Enterobacter cloacae* ATCC PTA-3882, que expresan en su superficie sustancias poliméricas parecidas al antígeno histo-sanguíneo tipo H, aumentaron la unión del virus y la infección de los linfocitos

(Jones *et al.*, 2015). Se obtuvo el mismo efecto cuando se utilizó el antígeno H purificado. Además, en analogía con los poliovirus, la unión de norovirus (GI.1 y GII.4) a carbohidratos HBGA de tipo A y B en la superficie de *E. coli* LMG8223 y *E. coli* LFMFP861, respectivamente, mejoró su estabilidad frente a los tratamientos térmicos (Li *et al.*, 2015). Finalmente, reforzando los datos observados *in vitro*, la eliminación de la microbiota mediante el uso de antibióticos redujo la infectividad de norovirus murino en ratones (Jones *et al.*, 2015) y evitó su infección persistente en un proceso que dependía del receptor para IFN- $\lambda$  (Walker & Baldrige, 2019). Se observó una situación similar con la infección por rotavirus murino EC en un modelo de ratón, donde el tratamiento con antibióticos redujo la infectividad viral y mejoró la respuesta de anticuerpos en suero y en mucosas a rotavirus (Lei *et al.*, 2016a). Sin embargo, los experimentos *in vivo* en el modelo de cerdo gnotobiótico con *E. cloacae* ATCC 13047 demostraron que, en oposición a los resultados *in vitro*, esta bacteria redujo la excreción de norovirus humano (GII.4) y que las células B no fueron la diana de la infección (Lei *et al.*, 2016b). Además, se ha establecido un sistema *in vitro* reciente para la infección por norovirus humano sin la participación de la microbiota basado en organoides derivados de células madre intestinales (Ettayebi *et al.*, 2016), para lo cual todavía existe un profundo debate sobre el estricto requisito de la microbiota para la infección por norovirus y el tropismo celular.

Los mecanismos subyacentes sobre cómo la microbiota promueve la infección por rotavirus y norovirus están lejos de ser entendidos y se desconoce si la unión a bacterias recubiertas con HBGAs o HBGAs libres participan en el proceso de entrada durante la infección, ayudando a los virus a realizar una unión productiva

o simplemente sirve a los virus para llegar a sus sitios de infección. También se ha propuesto que las células M pueden transportar a las bacterias cargadas de virus (Karst & Wobus, 2015), lo que les permitiría alcanzar sus dianas de infección. En cualquier caso, parece claro que ciertos virus intestinales hacen uso de la microbiota para modular algunos pasos de su proceso de infección.



## 2. OBJETIVOS

Dada la importancia de las infecciones por rotavirus y norovirus, el objetivo principal de la presente tesis doctoral ha sido estudiar las interacciones virus-hospedador a dos niveles diferentes. Por un lado, nos propusimos estudiar la respuesta inmune frente a ambos virus y por otro lado estudiar en detalle las interacciones entre diferentes genotipos de rotavirus y norovirus y los diferentes antígenos de grupo sanguíneo (HBGAs). El conocimiento de ambos tipos de interacciones permitirá diseñar estrategias antivirales para disminuir la morbilidad y la mortalidad causada por estos dos virus productores de gastroenteritis.

Para conseguir el objetivo principal de la presente tesis se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal, 3C3G3, frente a la variante epidémica GII.4-2006 del genotipo GII.4 de norovirus.
2. Estudiar cómo ha variado dicho epítipo a lo largo del tiempo en diferentes variantes de norovirus del genotipo GII.4 y su relación con la existencia de reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal.
3. Determinar los patrones de unión de norovirus de distintas variantes del genotipo GII.4 con los diferentes HBGAs.
4. Determinar el sitio de unión de los rotavirus humanos P[8] a HBGAs así como la relevancia del antígeno secretor (H) en dicha interacción.
5. Estudiar la prevalencia y el título de anticuerpos séricos anti-VP8\* de rotavirus frente a diferentes genotipos P (P[4], P[6], P[8], P[9], P[11], P[14] y P[25]) en la población de Valencia.



**3. Capítulo I: Caracterización de un nuevo epítipo conformacional de norovirus GII.4: implicaciones para las interacciones de los norovirus con el hospedador**



### 3.1. Introducción

Los norovirus (NoV) son los agentes etiológicos predominantes de gastroenteritis aguda en todo el mundo, causando brotes epidémicos y casos esporádicos (Patel *et al.*, 2009). En muchos países, los NoV se han convertido en la principal causa de gastroenteritis infantil desde la introducción de las vacunas contra rotavirus (Hall *et al.*, 2013), y también han sido reconocidos mundialmente como la principal causa de enfermedades asociadas a alimentos (Buesa & Rodríguez-Díaz, 2007; Kirk *et al.*, 2015). Los NoV pertenecen a la familia *Caliciviridae*, y actualmente, se clasifican en 10 genogrupos (GI a GX) (Chhabra *et al.*, 2019) subdivididos en más de 30 genotipos basados en la diversidad de secuencias de proteínas de la cápside. Sin embargo, la mayoría de las infecciones humanas por NoV son causadas por los genogrupos GI y GII. Además, en las últimas 2 décadas, el genotipo GII.4 ha sido el agente causante de > 95% de los brotes de gastroenteritis por NoV, con variantes virales epidémicas distribuidas globalmente que emergen cada 2 a 3 años (Tran *et al.*, 2013; White *et al.*, 1997). Los NoV son virus pequeños no envueltos, con un genoma de RNA de sentido positivo monocatenario no segmentado, que codifica las proteínas estructurales y no estructurales virales en tres pautas abiertas de lectura (ORF). ORF1 codifica las seis proteínas no estructurales, incluidas la proteasa viral y la RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp), mientras que ORF3 codifica una pequeña proteína básica, VP2, que interactúa con VP1 y estabiliza el virión (Vongpunsawad *et al.*, 2013). ORF2 codifica la proteína estructural principal VP1, que se organiza además en los dominios N-terminal (N), shell (S) y protuberante (P). El dominio P se divide en dos subdominios, P1 y P2 (Prasad *et al.*, 1999). El subdominio P1 forma la porción de anclaje del dímero P, conectándolo con el

dominio S y procurando la estabilidad de la partícula viral, mientras que el subdominio P2 está expuesto en la superficie de la proteína de la cápside y es la región más variable del virus. Tanto los epítomos principales para el inmunoreconocimiento como los dominios de unión al antígeno histo-sanguíneo (HBGA) residen dentro de este subdominio P2. La aparición y acumulación de mutaciones dentro del subdominio P2 son los principales impulsores de la evolución de las cepas GII.4 y dan como resultado nuevas cepas epidémicas con propiedades de unión a HBGA y antigenicidad alteradas (Allen *et al.*, 2008; Atmar *et al.*, 2014; Debbink *et al.*, 2013). Los genotipos GII.4 asociados con la mayoría de las pandemias de NoV han sido GII.4 US1995\_1996, Farmington\_Hills\_2002, GII.4 Hunter\_2004, GII.4 Den Haag\_2006b, GII.4 New Orleans\_2009 y, más recientemente, GII.4 Sydney\_2012. De estas seis cepas pandémicas, se ha postulado que las cuatro primeras son el resultado de la evolución mutacional de la cápside del dominio P, mientras que las dos variantes más recientes muestran eventos de recombinación adicionales entre ORF1 y ORF2 (van Beek *et al.*, 2013). A pesar de los avances recientes en el cultivo de norovirus *in vitro* (Ettayebi *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 2015), la falta histórica de un modelo *in vivo* (que imite la enfermedad) y de un sistema de replicación *in vitro* reproducible ha obstaculizado el estudio de los NoV, incluida una explicación al éxito evolutivo de las cepas GII.4. A pesar de estos desafíos, se han aplicado con éxito varias estrategias para el estudio de la inmunogenicidad y de las propiedades de unión al receptor de las cepas de norovirus. Las partículas pseudovíricas (VLPs) expresadas en células de mamíferos o insectos (Jiang *et al.*, 1992) y las partículas P expresadas en *Escherichia coli* (Tan & Jiang, 2005) muestran propiedades estructurales similares a las del virus nativo y mantienen

las propiedades antigénicas y la capacidad de unión a HBGA. Su uso condujo a la identificación de varios epítomos y dominios de unión a HBGA (Lindesmith *et al.*, 2011; Siebenga *et al.*, 2007; Zakikhany *et al.*, 2009). Para caracterizar aún más el impacto de la evolución de NoV GII.4 en la evasión inmune, analizamos la funcionalidad del epítomo reconocido por un anticuerpo monoclonal (MAb) (3C3G3) producido en nuestro laboratorio contra una cepa de NoV GII.4, y caracterizado aplicando las técnicas de “phage display” y mutagénesis dirigida. El epítomo reconocido está compuesto por 11 aminoácidos, dos de ellos, R397 y D448, implicados en la evasión del sistema inmune y en los patrones de reconocimiento de diferentes HBGA.



## **3.2. Material y métodos**

### **3.2.1. Expresión y purificación de VLPs NoV**

Las VLPs de las cepas NoV GI.1 Norwalk, GII.3, GII.4\_1999 (v0), GII.4\_2004 (v2) y GII.4 Den Haag\_2006b se expresaron en células de insecto tras la infección con baculovirus recombinantes, como describen Allen *et al.*, 2009.

Los cultivos en suspensión de células Sf9 fueron infectados con BAC-GII4v0, BAC-GII4v2 o BAC-GII.42006b a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 2-3 e incubados a 28°C durante 48-72 horas. Las VLPs se purificaron de la fase intracelular mediante un tratamiento con tampón fosfatado que contenía un 1% de detergente (IGEPAL, Sigma Aldrich) y pasos de centrifugación secuencial para su clarificación y finalmente a través de un gradiente discontinuo de sacarosa de un 15% y 60%. Las fracciones fueron recogidas y analizadas por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12% y observadas por microscopía electrónica.

### **3.2.2. Expresión y purificación de partículas P y dominios P de norovirus**

Se produjeron partículas P de NoV de distintos genogrupos. Del genogrupo I, se produjo la partícula P del genotipo GI.1 cepa Norwalk. En cuanto a las partículas correspondientes al genogrupo II se expresaron y purificaron las partículas de la cepa GII.9 VA207 y distintas variantes epidémicas de GII.4 que han ido apareciendo históricamente como VA387\_1996, Den Haag\_2006b y Sydney\_2012, así como cinco mutantes de la variante VA387\_1996. Tras realizar los análisis de secuencia pertinentes se seleccionaron tres residuos que parecían mostrar implicación con el sitio de unión y que eran diferentes en la cepa VA387\_1996 con respecto a la cepa Den Haag\_2006b. Se construyeron

dichos mutantes (M1 a M5): M1 (Q396R), M2 (N447D), M3 (NN-393 y 394-STT), M4 (M1 + M2) y M5 (M1 + M2 + M3). Todas ellas se expresaron y purificaron en *E. coli* BL21 siguiendo el protocolo que se detalla a continuación.

Los genes que codifican la proteína de la cápside VP1 de los NoV VA387 (genotipo GII.4) y Norwalk (genotipo GI.1) (números de acceso a GeneBank AY038600 y M87661, respectivamente) fueron sintetizados por GeneArt (Life Technologies). La región que codifica el dominio P de la cepa VA387 se amplificó a partir de los genes sintetizados con primers p524 (5'-GCA CGG ATC CTC AAG AAC CCT TAA CCA TTC ACC-3') y p590 (5'-GCA TGG GGG **CTT AGC** AAA AGC AAT CGC CGG GCA ATC GCA TAA TGC ACG CAC GTC TGG CCC CCC CCG CCG CGC-3'). El cebador inverso incorpora las bases que codifican un péptido rico en cisteína CDCRGDCFC para favorecer la estabilidad de la partícula (Tan & Jiang, 2005). Para amplificar el fragmento que codifica el dominio P de la cepa Norwalk se utilizó una modificación de los cebadores p649 (p649-mod: 5'-GCG TGG ATC CTG CAA CGG CCG TTG CCA GAA AAC CAG GCC **CTT CAC** AC-3'), incorporando el dominio rico en cisteínas del CNIRC en el cebador directo y el cebador reverso p494 (GGA CGC GGC CGC **TTA** TCG GCG CAG ACC AAG CCT-3'). Los sitios de restricción introducidos para la clonación están subrayados y los codones de parada están en negrita. Las amplificaciones de PCR se realizaron con la polimerasa Pfx (Invitrogen) y los fragmentos amplificados fueron digeridos con *Bam*HI y clonados en el vector pQE80 (Qiagen) digerido con *Bam*HI y *Sma*I y transformados en *E. coli* DH10B. La integridad de las secuencias se verificó mediante secuenciación y los plásmidos generados se transfirieron a *E. coli* BL21 portando el plásmido pREPGroES/EL que codifica las chaperonas de *E. coli* para mejorar la

solubilidad de las partículas P recombinantes. Para mejorar aún más la solubilidad y recuperación de las partículas P recombinantes se cultivó *E. coli* durante la noche a 25°C en medio LB y se indujo con 0,2 mM IPTG durante 4 horas a la misma temperatura. Después de esto, las células bacterianas fueron recuperadas por centrifugación (4100 rpm durante 15 minutos) y congeladas a -80°C. Las partículas P de norovirus se purificaron utilizando un sistema FPLC Äkta Prime (GE Healthcare) y columnas FastFlow Ni-NTA de 1 ml (GE Healthcare). Los sedimentos de células bacterianas fueron descongelados y resuspendidos en tampón A (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 50 mM NaSO<sub>4</sub>) complementados con 0.5 mM ditioneitol, 0.5 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo y 1 mg/ml de lisozima e incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los lisados celulares se obtuvieron por sonicación en hielo seguida de centrifugación a 20.000×g durante 20 min a 4°C. Los lisados clarificados se cargaron en las columnas de Ni-NTA que se lavaron con tampón A con un gradiente de imidazol de 0 a 500 mM. Para la elución del tampón de las partículas P se utilizó el tampón A con 2 M imidazol. Las fracciones que contienen proteínas recombinantes se recogieron y almacenaron a 4°C.

El gen GII.9 VA207 se adquirió como un gen sintético (GeneArt; Invitrogen). La partícula P Den Haag\_2006b se subclonó de una construcción VP1 anterior disponible en nuestro laboratorio (Carmona-Vicente *et al.*, 2016) usando los cebadores P524 y P590 descritos anteriormente (Tan *et al.*, 2005), y la variante GII.4 Sydney\_2012 se clonó de una muestra clínica usando los cebadores P-Sydney directo (5'-GCA CGG ATC CTC AAG AAC TAA ACC ATT CTC TG-3') y reverso (5'-GCA TGC GGC CGC TTA GCA AAA GCA ATC GCC ACG GCA ATC GCA TAC TGC ACG TCT ACG CCC CGT TCC-3 ').

El dominio P de la cepa GII.4 Apeldoorn\_2007 también se produjo y purificó. El RNA se extrajo utilizando el Mini Kit de ARN viral QIAmp (Qiagen) de una muestra de heces que contenía la variante NoV GII.4 Apeldoorn\_2007. El cDNA se obtuvo mediante RT-PCR utilizando los primers P\_GII-4F (5'-GAN GAT GTC TTC ACA GTC TCT CTC TT-3') y P\_GII-4R (5'-CAT TCG GGG GGA GAG TAG ACA-3') (Carmona Vicente Noelia, 2014). El producto amplificado se secuenció y sometió a una PCR anidada para generar el dominio P amplificado de VP1 con los siguientes primers: P-REV\_PET, (5'-CTA TTC GGG GGG AGA GTA GAC A-3'), y P-FOR\_PET, (5'-CAC CGA TGT CTT CAC AGA GTC TCT CTT-3'). Un fragmento de 790-bp (nt 579 -1369 (aa 194-456) fue clonado en el vector pET100/D-TOPO que luego fue transformado en células competentes de *E. coli* One Shot® TOP10 para la expresión de la proteína P recombinante 6xHis-tagged por células BL21 (Life Technologies). El polipéptido 6xHis-tagged fue purificado por cromatografía de afinidad en columnas de níquel (agarosa Ni-NTA, Qiagen), en condiciones de desnaturalización (8 M urea), y renaturalizado por diálisis, disminuyendo progresivamente la concentración de urea en un tampón Tris-HCl de 50 mM (pH 7,4) que contenía 100 mM NaCl y 1 mM EDTA. Esta construcción se conoce como un dominio P y no una partícula P porque carece del péptido rico en cisteína que estabiliza la formación de partículas P.

Después de la cromatografía de afinidad se añadió EDTA 10 mM a las partículas P resultantes para quelar el níquel co-eluido, y la mezcla se cargó en una columna preparativa de cromatografía de exclusión por tamaño HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR (GE Healthcare Life Sciences) equilibrado con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las fracciones correspondientes a las

partículas P (masas moleculares entre 750 y 1.100 kDa) se extrajeron y almacenaron a -20 °C en PBS que contenía 10% de glicerol.

### **3.2.3. Anticuerpos utilizados en el presente estudio.**

Se obtuvo el anticuerpo monoclonal 3C3G3 inmunizando un ratón BALB/c hembra de 6 semanas de edad con VLPs de GII.4 Den Haag\_2006b con adyuvante de Freund mediante inyección intraperitoneal. Tres días después de la inyección de inmunización final, los linfocitos de bazo de ratón se fusionaron con células de mieloma Sp2 / 0-Ag14, los hibridomas se seleccionaron mediante un ensayo ELISA y se subclonaron mediante dilución límite. Uno de los hibridomas en crecimiento produjo un MAb anti-GII.4\_2006b (3C3G3), que se purificó utilizando columnas HiTrap proteína A - sepharosa (GE Healthcare). Dos anticuerpos monoclonales previamente obtenidos y caracterizados también se utilizaron en el presente estudio: el MAb anti-v0.8 generado contra la variante pre-epidémica GII.4 v0\_2000 y el MAb anti-v2.5 producido contra la variante GII.4 v2\_2004 (Allen *et al.*, 2009). Se obtuvieron dos antisueros policlonales inmunizando conejos con partículas GII4 VA387\_1996 P (P-PAb) o con una mezcla de VLPs GII.4 v0\_2000, GII.4 v2\_2004 y GII.3 (HPA-PAb).

### **3.2.4. Caracterización de anticuerpos por ELISA**

Las placas de microtitulación de 96 pocillos (Corning) se sensibilizaron con las diferentes variantes VLPs, partículas P o dominio P (ver arriba) a 1 µg/ ml en tampón carbonato / bicarbonato (pH 9.2) y se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon durante 1 hora a 37°C con PBS-Tween al 0,05% (PBS-T) con albúmina de suero bovino al 3% (BSA). Los anticuerpos primarios (anti-

v0.8 MAb, anti-v2.5 MAb, 3C3G3 MAb, P-PAb y HPA-PAb) se agregaron a las placas recubiertas en diluciones seriadas 1/2, comenzando en 1/1,000 hasta 1/128,000 en PBS-T con 1% de BSA. La unión se detectó con anti-IgG anti-ratón conjugado con peroxidasa (HRP) a 1/4,000 o IgG anti-conejo a la misma dilución (Santa Cruz Biotechnology), según corresponda. Las reacciones se desarrollaron mediante la adición de OPD (diclorhidrato de o-fenilendiamina; Sigma) y se detuvieron tras 10 minutos de incubación con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M. La absorbancia se midió a 492 nm en un lector de microplacas Multiskan Spectrum (Thermo Fisher Scientific). Los ensayos se realizaron por triplicado y se incluyeron controles negativos y en blanco. El valor medio de los controles negativos (sin anticuerpo primario) más 3 desviaciones estándar (DE) se utilizó como valor de corte.

### **3.2.5. Ensayo de bloqueo de unión a la saliva**

Las placas de microtitulación (Corning, NY) se recubrieron con saliva de un donante secretor positivo diluido 1/500 en tampón carbonato / bicarbonato (pH 9,2) y se incubaron a 37 °C durante 1 hora y a 4 °C durante la noche. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T y se bloquearon con PBS con BSA al 3% durante 1 hora a 37 °C. Las partículas P GII.4 2006b (1 µg / ml) se incubaron durante 1 h con diluciones seriadas del MAb 3C3G3 en PBS-T a 37°C. La mezcla se añadió a la placa recubierta y se incubó durante 1 h a 37°C. Después de tres lavados, se añadió el anticuerpo policlonal (P-PAb) a una dilución de 1/1.000. Finalmente, se añadió un anticuerpo anti-conejo conjugado con HRP a 1/4.000 (Santa Cruz Biotechnology). El sustrato OPD se usó para detectar las reacciones, que se detuvieron después de 20 minutos mediante la adición de

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M. La absorbancia se midió a 492 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado, y el bloqueo de la unión se expresó como porcentajes de señal en relación con la densidad óptica de control de bloqueo negativo a 492 nm (OD<sub>492</sub>) (partículas P sin ningún agente de bloqueo).

### **3.2.6. Caracterización del epítopo 3C3G3 mediante “phage display”**

Las librerías de péptidos para la técnica de “phage display” Ph.D.-C7C (1,5 x 10<sup>13</sup> UFP/ml) y la cepa bacteriana huésped *E. coli* ER2738 se adquirieron de New England BioLabs (Beverly, MA, EE. UU.).

La selección de fagos se llevó a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos mediante recubrimiento directo, siguiendo el manual del kit de la librería Ph.D.-C7C. Se recubrió una placa de 96 pocillos con el MAb 3C3G3 purificado (100 µg / ml) en 150 µl de tampón de carbonato (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 8,6) por pocillo y se incubó durante la noche a 4°C con agitación suave. La unión inespecífica se bloqueó mediante incubación con 300 µl de tampón de bloqueo (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 8,6, con BSA a 5 mg/ml) durante 1 hora a 4°C. Para el procedimiento de unión, se incubaron aproximadamente 2 x 10<sup>11</sup> fagos UFP/ml diluidos con tampón Tris Buffer Saline con 0,1% Tween-20 (TBST) en la placa revestida con el anticuerpo 3C3G3 durante 45 minutos a temperatura ambiente en agitación. Los fagos no unidos se eliminaron mediante lavado con TBS al 0,01% de Tween-20. Los fagos unidos al MAb 3C3G3 se eluyeron con 100 µl de tampón glicina (glicina-HCl 0,2 M, pH 2,2) que contenía 1 mg/ml de BSA y luego se neutralizaron con 15 µl de Tris-HCl 1 M, pH 9,1. Los fagos eluidos se amplificaron y purificaron para usarse en rondas de selección posteriores y para infectar la bacteria *E. coli* ER2738 para la amplificación y titulación. En la segunda y tercera ronda de

*panning*, la astringencia del lavado se incrementó al aumentar el número de lavados y la cantidad de Tween 20 en rondas consecutivas. Tras cada lavado con mayor cantidad de Tween 20 se eliminan más interacciones inespecíficas, de forma que tras la elución los fagos obtenidos serán más específicos frente al antígeno.

Después de tres rondas de selección - elución, se seleccionaron clones positivos individuales de placas LB/IPTG/X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -d-galactopiranosido), se amplificaron y se secuenciaron. El cebador utilizado para la secuenciación fue 96 gIII (5'-CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3'), provisto en el kit. Las secuencias que codifican 7 aminoácidos fueron identificadas y utilizadas para predecir el epítipo (Carmona-Vicente, 2014) (Carmona Vicente Noelia, 2014).

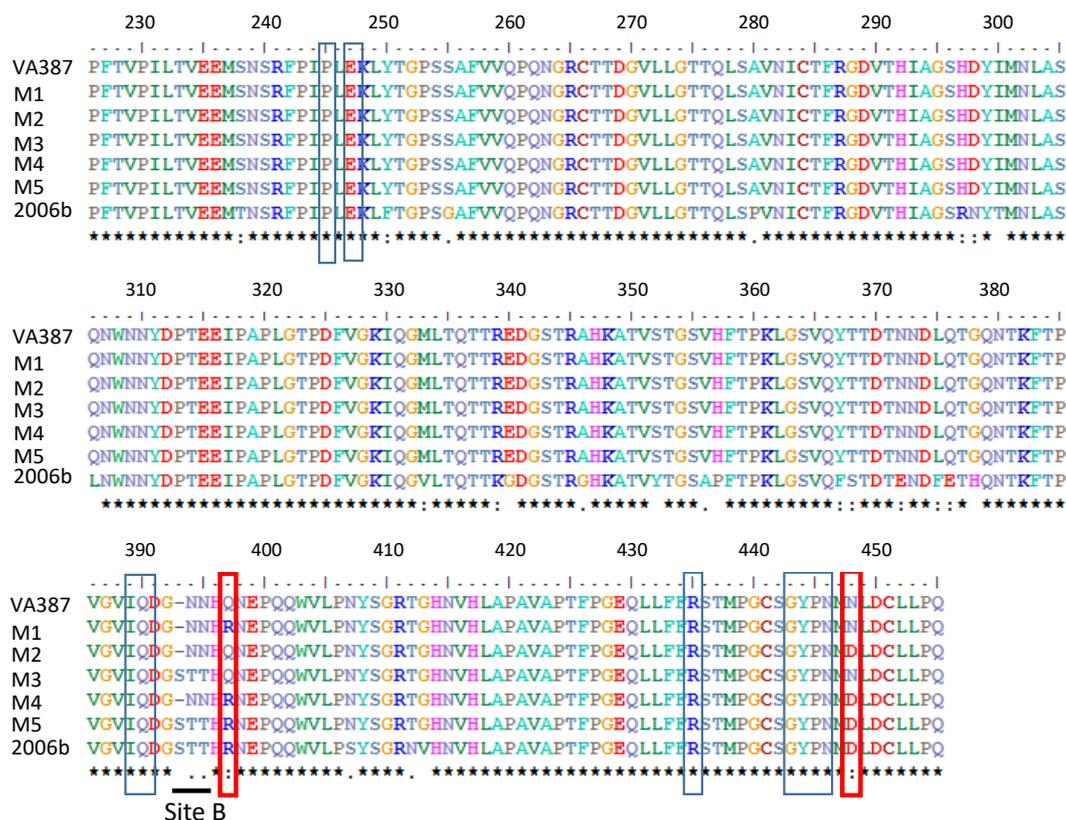
### **3.2.7. Modelado de epítipos**

El modelado conformacional del epítipo se realizó utilizando el servidor Pepitope (Mayrose *et al.*, 2007). La estructura de la cepa NoV GII.4 VA387\_1996 se utilizó como modelo para localizar el epítipo reconocido por el MAb 3C3G3 (Protein Data Bank [PDB] ID, 2OBR). El programa Modeller (<http://salilab.org/modeller/>) (versión 9.15) se utilizó para la homología y el modelo comparativo de estructuras de proteínas tridimensionales (Sali & Blundell, 1994). Se utilizó la estructura de la cepa GII.4 VA387\_1996 como molde (PDB ID 2OBR) y se proporcionó una alineación adecuada con las secuencias de los mutantes M1 a M5 (ver más abajo). El software Modeler creó el número requerido de modelos y estimó los parámetros de calidad de los modelos. Se eligió el modelo con la mejor puntuación para cada mutante. Las estructuras se visualizaron con el

programa PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System, versión 0.99; Schrodinger, LLC

### 3.2.8. Mutagénesis dirigida

Para confirmar los residuos de aminoácidos que forman parte del epítipo 3C3G3, se usó la cepa GII.4 VA387\_1996 (no reconocida por el anticuerpo) como molde para incorporar los aminoácidos presentes en el epítipo predicho. Se construyeron cinco mutantes mediante la introducción de las siguientes mutaciones en la secuencia GII.4 VA387\_1996: M1 (Q396R), M2 (N447D), M3 (NN-393 y 394 STT), M4 (M1 más M2) y M5 (M1 más M2 más M3) (Figura 7).



**Figura 7.** Alineamiento de los residuos de aminoácidos deducidos de GII.4 VA387\_1996, los mutantes M1 a M5 y la variante Den Haag\_2006b. Los 11 residuos que forman el epítipo previsto del 3C3G3 se encuentran dentro de los rectángulos en rojo (R397 y D448).

El sistema de mutagénesis dirigida GeneArt® (Thermo Fisher) fué utilizado para incorporar las mutaciones deseadas con cebadores solapantes.

Los cebadores utilizados para crear los mutantes se describen en la Tabla 3. M1 y M2 se produjeron en un solo paso, pero M3 se construyó en dos pasos, primero usando los cebadores MUT\_3\_1\_FW y MUT\_3\_1\_RV y luego los cebadores MUT\_3\_2\_FW y MUT\_3\_2\_RV en una segunda reacción de mutagénesis. La construcción M4 (un mutante doble que incorpora M1 y M2) se realizó usando la construcción M1 como molde e incorporando la mutación M2 después. Para crear el mutante M5, se utilizó la construcción M3 como molde, usando los cebadores MUT\_1\_3\_FW y MUT\_1\_3\_RV para incorporar M1 sin cambiar la mutación M3 que ya estaba presente, seguido de la adición de la mutación M2. Los transformantes se analizaron por PCR y secuenciación. Los transformantes positivos se transfirieron a la cepa GroES / EL de *E. coli* BL21, y las partículas P mutantes se produjeron y purificaron como se ha descrito anteriormente.

Cebador	Secuencia	Mutante
MUT_1_FW	5'-CAGGATGGTAATAACCACAGGAATGAACCCAGCAATG-3'	M1 y M4
MUT_1_RV	5'-CATTGCTGGGGTTCATTCCTGTGGTTATTACCATCCTG-3'	M1 y M4
MUT_2_FW	5'-CGGGTATCCCAACATGGACCTGGATTGCCTACTC-3'	M2, M4 y M5
MUT_2_RV	5'-GAGTAGGCAATCCAGGTCCATGTTGGGATACCCG-3'	M2, M4 y M5
MUT_3_1_FW	5'-CGTCATCCAGGATGGTAGCACCCACCAAAATGAACCC-3'	M3 y M5
MUT_3_1_RV	5'-GGGGTTCATTTTGGTGGGTGCTACCATCCTGGATGACG-3'	M3 y M5
MUT_3_2_FW	5'-CCAGGATGGTAGCACAACCCACCAAAATGAACC-3'	M3 y M5
MUT_3_2_RV	5'-GGTCTACCATCGTGTGGGTGGTTTTACTTGG-3'	M3 y M5
MUT_1_3_FW	5'-CGTCATCCAGGATGGTAGCACAACCCACAGGAATGAACCCAGCAATG-3'	M5
MUT_1_3_RV	5'-CATTGCTGGGGTTCATTCCTGTGGTTGTGCTACCATCCTGGATGACG-3'	M5

**Tabla 3.** Cebadores utilizados en la mutagénesis dirigida del epítipo 3C3G3.

### **3.2.9. Resonancia superficial de plasmón (SPR)**

La capacidad de las partículas P (GII.4 VA387\_1996, M1, M2, M3, M4, M5 y Den Haag\_2006b) para unirse a tres MAbs diferentes (3C3G3, anti-V0.8 y anti-V2.5) fue estudiada por resonancia superficial de plasmón (SPR) utilizando el instrumento Biacore T100 (Biacore; GE Healthcare). Se inmovilizó un anticuerpo anti-His (Clontech) en las superficies de los chips CM5 (GE Healthcare) y se usó como un anticuerpo de captura para partículas P. La inmovilización se logró utilizando un kit de unión de aminas (GE Healthcare). Brevemente, 5.000 unidades de resonancia (RU) del anticuerpo monoclonal (MAb) anti-His se inmovilizaron en el canal 2, dejando el canal 1 como referencia. Cada partícula P se capturó haciendo fluir una solución de 100  $\mu\text{g/ml}$  durante 100 s a una velocidad de flujo de 5  $\mu\text{l/min}$  en el tampón que recomienda el fabricante como diluyente para las muestras a analizar, HBS suplementado con 0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20 (HBS-EP<sup>+</sup>) (GE Healthcare), hasta alcanzar un nivel de captura de  $\sim 100$  RU. Se inyectaron varias diluciones de cada MAb (100 nM, 50 nM, 25 nM, 12.5 nM y 6.125 nM), comenzando con el más diluido y terminando con el más concentrado, en el chip CM5 a una velocidad de flujo de 30  $\mu\text{l/min}$ . en tampón HBS-EP + (GE Healthcare) a 25 °C en experimentos de cinética de ciclo único. El tiempo de unión fue de 60 s, con un tiempo de disociación final de 600 s. Cada interacción se probó en tres experimentos independientes. Las cinéticas de unión se analizaron con el software de evaluación Biacore.

### **3.2.10. Unión de partículas P a neoglicoconjugados**

La unión de las partículas P a cinco neoglicoproteínas (preparados de glicoproteínas unidos covalentemente a HSA) diferentes (Tabla 4) con las estructuras de oligosacáridos del antígeno H (grupo sanguíneo O), grupo sanguíneo A, grupo sanguíneo B, Lewis X (Le<sup>x</sup>) y sialil-Lewis X (SiLe<sup>x</sup>) se analizaron mediante ELISA. Todas las neoglicoproteínas se obtuvieron de Isosep AB (Tullinge, Suecia). Los oligosacáridos fueron obtenidos conjugados a la albúmina sérica humana (HSA) a través de un espaciador de acetilfenilendiamina (APD) o aminofeniletíl (APE), con 10 a 30 oligosacáridos por molécula de proteína.

Las placas de microtitulación (Corning, NY) se recubrieron con los diferentes neoglicoconjugados a 1  $\mu\text{g/ml}$  en tampón carbonato / bicarbonato (pH 9,2) y se incubaron a 37°C durante 1 hora a 4°C durante la noche. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T y se bloquearon con PBS con BSA al 3% durante 1 hora a 37°C. Las partículas P se añadieron a 1  $\mu\text{g/ml}$  en PBS-T, y las placas se incubaron durante 90 minutos a 37°C. Después de tres lavados, se añadió el suero policlonal (P-PAb) a las placas a una dilución de 1/1.000. La unión se detectó con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con HRP a 1/4.000 (Santa Cruz Biotechnology). Las reacciones se revelaron mediante la adición de OPD y se detuvieron después de una incubación de 20 minutos con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M. La absorbancia se midió a 492 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado y se incluyeron controles negativos (HSA sin conjugar con el oligosacárido ó no funcionalizado a 1  $\mu\text{g/ml}$ ) y en blanco. La unión se expresó como porcentajes de señal en relación con la mayor OD<sub>492</sub>.

Neoglicoconjugado	Estructura
H tipo 1- HSA	Fuca $\alpha$ 2Gal $\beta$ 3NAcGlc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc-APD
SiLe <sup>x</sup> -HSA	Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4(Fuca $\alpha$ 3)NAcGlc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc-APD
Le <sup>x</sup> - HSA	Gal $\beta$ 4(Fuca $\alpha$ 3)NAcGlc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4(Fuca $\alpha$ 3)NAcGlc-APD
A-tri HSA	NAcGal $\alpha$ 3(Fuca $\alpha$ 2)Gal $\beta$ -O-APE
B-tri HSA	Gal $\alpha$ 3(Fuca $\alpha$ 2)Gal $\beta$ -O-APE

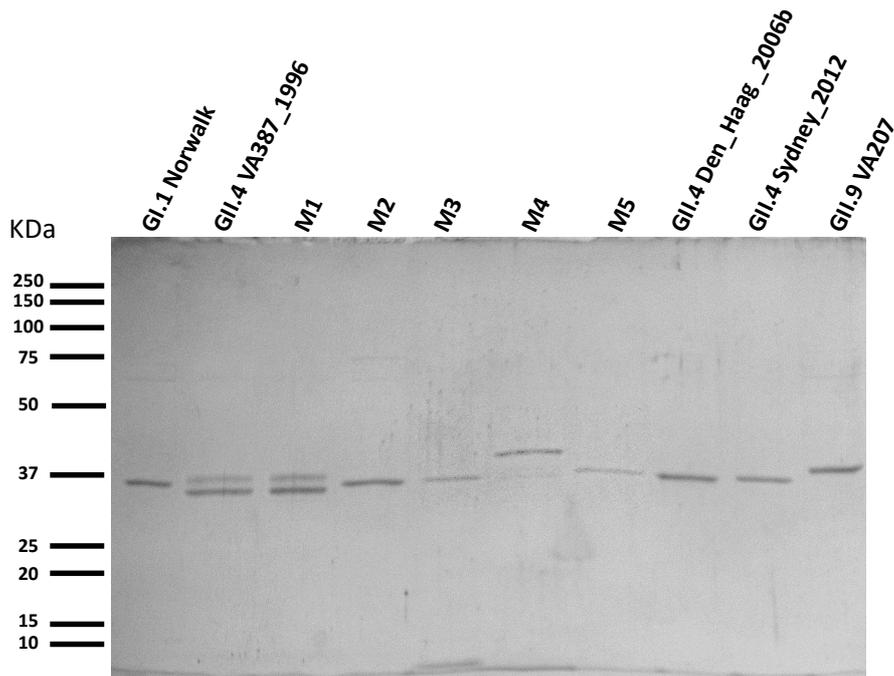
**Tabla 4.** Neoglicoconjugados utilizados en el presente estudio.



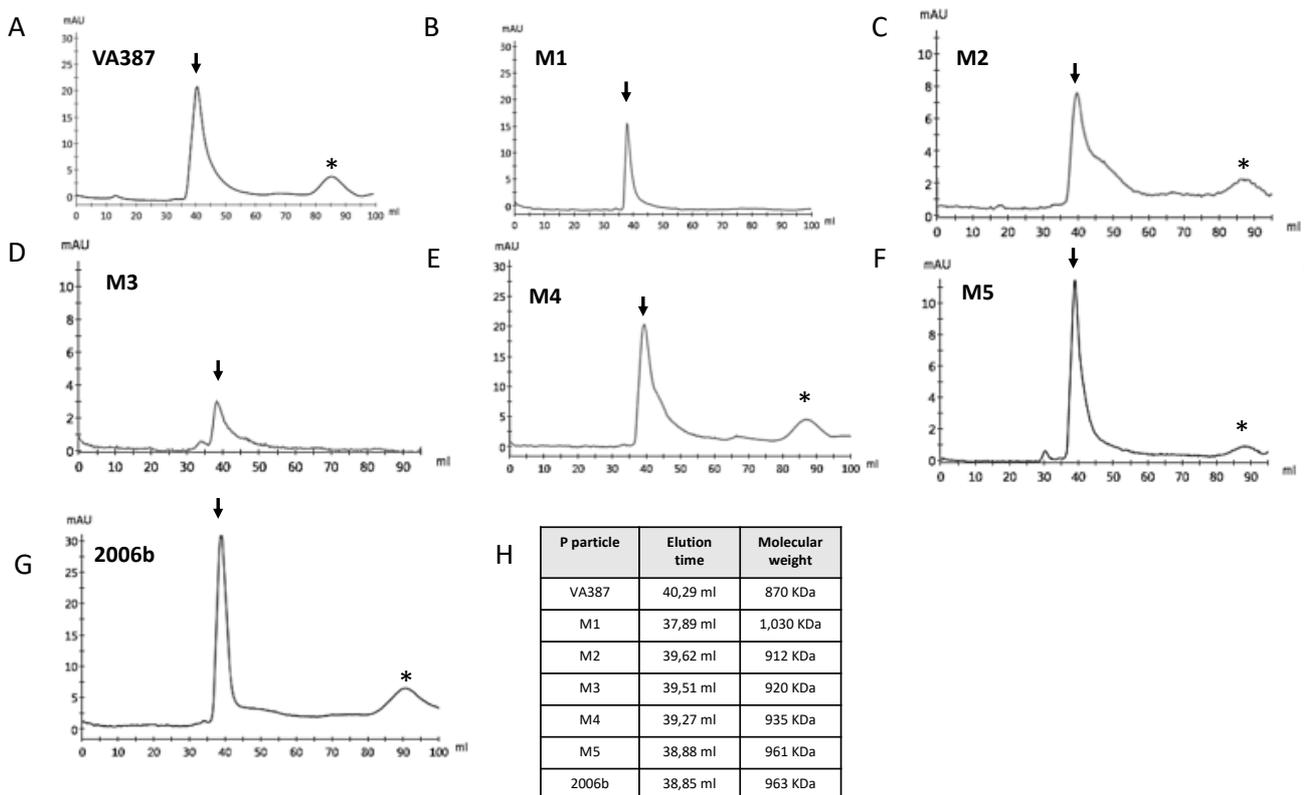
### **3.3. Resultados**

#### **3.3.1. Producción y purificación de partículas P de norovirus**

Con el objetivo de estudiar la inmunogenicidad y la capacidad de unión de diferentes cepas de NoV a varios HBGA se produjeron un total de 10 partículas P, una correspondiente al genotipo Norwalk GI.1, cuatro correspondientes a diferentes genotipos GII (cepas GII.9 VA207, GII4 VA387\_1996, GII.4 Den Haag\_2006b y GII4 Sydney\_2012), y el resto obtenido por mutagénesis dirigida de la partícula P GII.4 VA387\_1996 (M1 a M5). Todas las proteínas mostraron una masa molecular cercana a la masa esperada (36 kDa) pero con pequeñas diferencias. La variante GII4 VA387\_1996 mostró una doble banda típica para la cepa. Esta doble banda también estaba presente en el mutante M1 (Q396R). El mutante M2 (N447D) migró como una banda única, al igual que todas las demás construcciones, excepto el mutante doble M4, que mostró una movilidad más baja en el gel (Figura 8). Las partículas P se purificaron además por cromatografía de exclusión molecular. Los resultados mostraron que la mayoría (más del 80%) de las proteínas produjeron partículas formadas, como se puede observar en la figura 9. El volumen de elución fue ligeramente diferente para cada preparación, variando de 37.89 ml (M1) a 40.29 ml (VA387), que corresponde de 1.030 kDa a 870 kDa (Figura 9). En total, pudimos producir y purificar 10 partículas P diferentes, que se utilizaron en ELISA, SPR y ensayos de unión.



**Figura 8.** Gel SDS-12% PAGE teñido con azul de Coomassie que muestra las 10 diferentes partículas P utilizadas en el presente estudio. Los pesos moleculares se indican con barras a la izquierda.



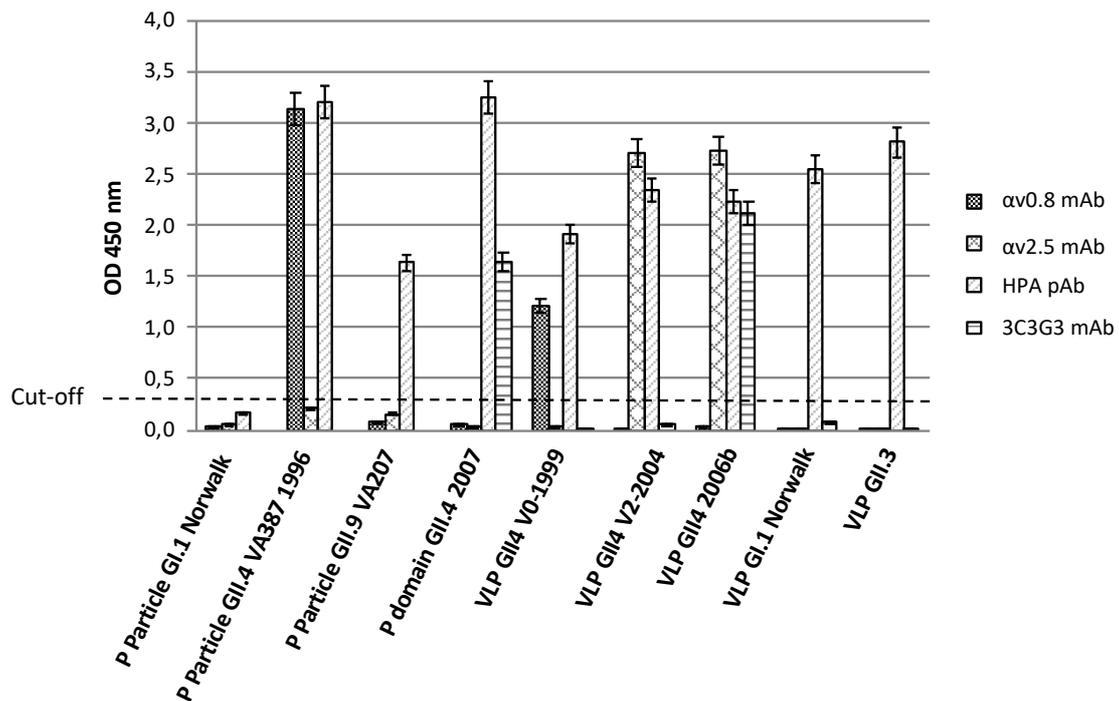
**Figura 9.** (A a G) Cromatogramas que muestran la cromatografía de exclusión molecular de GII.4 VA387\_1996, los mutantes M1 a M5 y las partículas P-Den Haag\_2006b. Las flechas indican los picos de elución correspondientes a las partículas P con una masa molecular esperada de 840 kDa. Los asteriscos (\*) marcan los picos de elución de las proteínas no particuladas. (H) Volúmenes de elución y masas moleculares calculadas de preparados de partículas P.

### **3.3.2. Caracterización del anticuerpo monoclonal (MAb) por ELISA**

Para dilucidar los patrones de reactividad de cada uno de los MAb frente a diferentes genogrupos, genotipos y variantes de norovirus, se realizó la caracterización inicial de los MAb 3C3G3, anti-v0.8 y anti-v2.5 mediante ELISA utilizando un conjunto de antígenos (Tabla 5 y Figura 10). Como control, se utilizó el HPA-PAb. El anticuerpo 3C3G3 reconoció solo su VLP homóloga (GII.4 Den Haag\_2006b) y el dominio P GII.4 Apeldoorn\_2007, más estrechamente relacionado. Sorprendentemente, no reconoció las partículas GII.4 v2\_2004 VLP y GII.4 VA387\_1996 P, dos variantes diferentes dentro del mismo genotipo. Este resultado es similar a los obtenidos con los anticuerpos monoclonales (MAb) anti-v0.8 y anti-v2.5. El MAb anti-v0.8 reconoció eficientemente su VLP homóloga GII.4 v0\_1999 y la partícula GII.4 VA387\_1996 P, mientras que el MAb anti-v2.5 reconoció solo su VLP homóloga GII.4 v2\_2004 y el antígeno GII.4 2006b más cercano, pero no el dominio GII.4 Apeldoorn\_2007 P. El anticuerpo policlonal HPA pudo reconocer todos los antígenos probados, excepto las partículas P GI.1 (Tabla 5). Estos resultados confirman que la rápida evolución de las variantes GII.4 de norovirus parece estar impulsada por la presión de anticuerpos en el huésped, lo que favorece la aparición de variantes de escape de los anticuerpos.

Antígeno de norovirus	Reactividad del anticuerpo ( $K_D$ [nM])				
	HPA-PAb	P-PAb	MAb 3C3G3	MAb Anti-v0.8	MAb Anti-v2.5
VLP GI.1 Norwalk	+	ND	-	-	-
VLP GII.4-1999	+	+	-	+	-
VLP GII.4-2004	+	+	-	-	+
VLP GII.3	+	+	-	-	-
P-GI.1 Norwalk	-	ND	-	-	-
P-GII.4-1996	+	+	-	+ (47 ± 35)	-
P-GII.4-1996 M1	+	+	-	+ (72 ± 49)	-
P-GII.4-1996 M2	+	+	-	+ (7 ± 1)	-
P-GII.4-1996 M3	+	+	-	+ (12 ± 3)	-
P-GII.4-1996 M4	+	+	+ (153 ± 74)	+ (7 ± 1)	-
P-GII.4-1996 M5	+	+	+ (25 ± 12)	+ (12 ± 3)	-
P-GII.4-2006b	+	+	+ (2.1 ± 1)	-	+ (11 ± 3)
P-GII.4-2012	+	+	-	-	-
P domain GII.4-2007	+	+	+	-	-

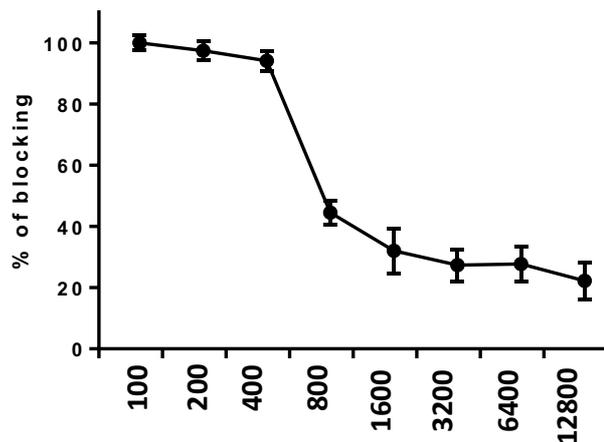
**Tabla 5.** Reacciones de los anticuerpos frente a diferentes antígenos de norovirus por ELISA y constantes de afinidad (KD) estimadas por resonancia superficial de plasmón. += reconocimiento; -=ausencia de reconocimiento; ND= no determinado.



**Figura 10.** Propiedades de la unión de cuatro anticuerpos, anti-v0.8, anti-v2.5, 3C3G3 y HPA PAb, a un panel de antígenos de norovirus (VLP, partículas P y dominio P) analizados por ELISA. Para mayor claridad, solo se representan las diluciones 1/1,000. Las barras de error indican las desviaciones estándar de tres réplicas. La línea horizontal indica el valor de corte del ELISA.

### 3.3.3. El anticuerpo monoclonal (Mab) 3C3G3 bloquea la unión de las partículas P a la saliva

El objetivo principal del presente estudio fue caracterizar el epítipo de un MAb dirigido a la proteína de la cápside viral para proporcionar una explicación de cómo ocurre la evasión a los anticuerpos en las variantes de norovirus GII.4. Era importante saber si el MAb 3C3G3 podía bloquear la unión de norovirus a sus receptores. Por esta razón, se realizó un ensayo de bloqueo de unión a la saliva, y los resultados confirmaron que el MAb 3C3G3 es capaz de bloquear la unión de las partículas GII.4 Den Haag\_2006b P a la saliva de un individuo secretor positivo de una manera dependiente de la dosis (Figura 11).

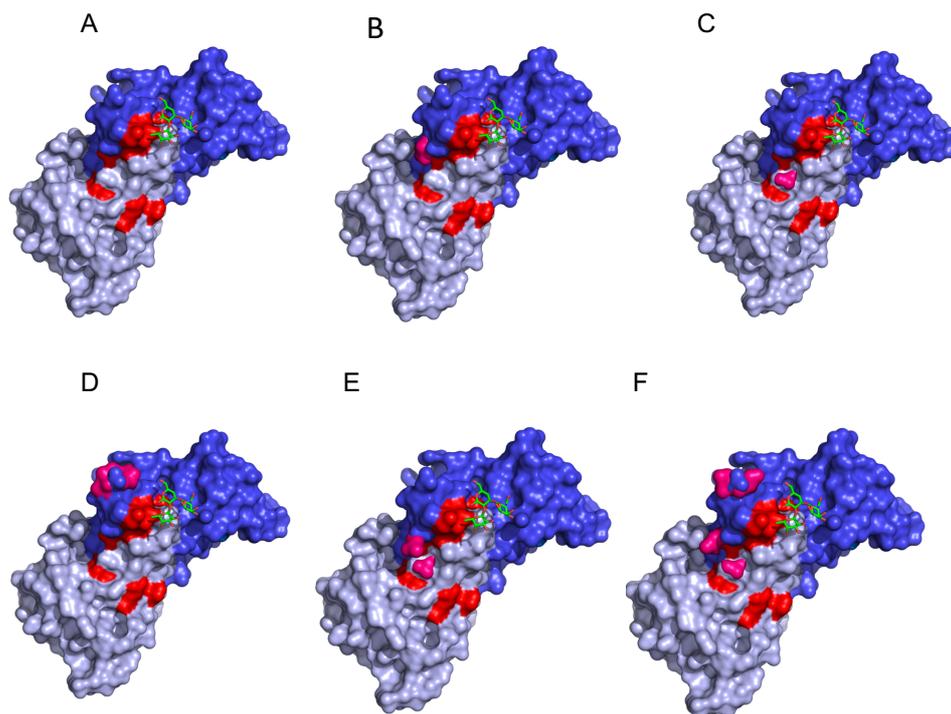


**Figura 11.** Bloqueo de la unión de partículas GII.4 Den Haag\_2006b P a la saliva secretora positiva por el 3C3G3 MAb. Las barras de error indican las desviaciones estándar de tres réplicas. Los números en el eje x indican las concentraciones del MAb 3C3G3.

### 3.3.4. Caracterización del epítipo del anticuerpo monoclonal 3C3G3 por “phage display” y mutagénesis dirigida

Con el fin de caracterizar el epítipo reconocido por el MAb 3C3G3, se aplicó la técnica de “phage display”, seguida de mutagénesis dirigida. Después de tres

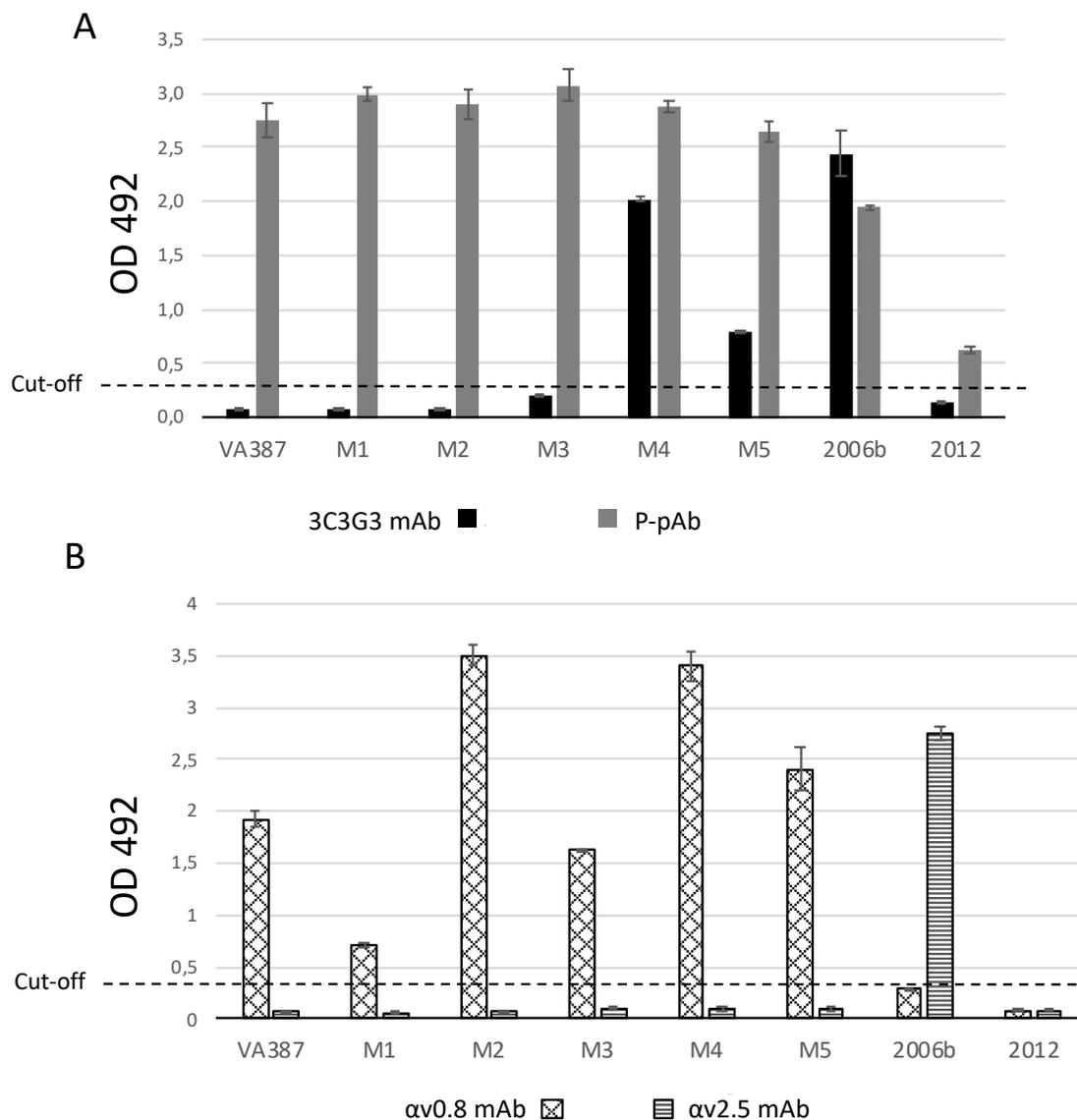
rondas de panning, se obtuvo una secuencia de consenso de 11 aminoácidos. El epítipo predicho estaba formado por los siguientes aminoácidos: P245, E247, I389, Q390, R397, R435, G443, Y444, P445, N446, y D448 de la variante GII.4 Den Haag\_2006 (Figura 7). Tres de estos aminoácidos están dentro del subdominio P2 (I389, Q390 y R397), y los otros ocho están dentro del subdominio P1 (Figura 12).



**Figura 12.** Modelos estructurales que muestran las superficies de los diferentes mutantes producidos en el presente estudio. El subdominio P1 se muestra en gris y el subdominio P2 en azul. El grupo sanguíneo, trisacárido tipo A, se localizó de acuerdo con el PDB ID 2OBS y puede verse en una representación en varillas. (A) Estructura del tipo silvestre VA387\_1996 con los residuos formando el epítipo 3C3G3 en rojo. (B, C y D) Mutantes individuales M1, M2 y M3, respectivamente. (E) Modelo del mutante doble M4. (F) Modelo del mutante múltiple M5. Todas las mutaciones se muestran en color rosa. Sólo el mutante M5 tiene el carboxilato aniónico D448 (RCOO<sup>-</sup>) y el amonio catiónico R397 (RNH<sub>3</sub><sup>+</sup>) en una conformación estrecha que aumenta la posibilidad de formación de puentes salinos, lo que permite la estabilización del epítipo 3C3G3.

Para confirmar el epítipo se realizó la mutagénesis dirigida, utilizando la partícula P de la variante GII.4 VA387\_1996 como estructura molde. Esta variante no fue reconocida por el MAb 3C3G3, y sólo 2 residuos fueron diferentes

entre las dos proteínas del epítipo predicho, R397 y D448 (figura 7). Se produjeron cinco mutantes como se describe en Material y métodos (M1 [Q396R], M2 [N447D], M3 [NN-393, 394 STT], M4 [M1 más M2], y M5 [M1 más M2 más M3]), y la reactividad del MAb 3C3G3 contra los mutantes se ensayó por ELISA. Además de los mutantes, se añadieron dos nuevas partículas P al experimento: la variante P GII.4 Den Haag\_2006 como control positivo y la variante P GII.4 Sydney\_2012 para evaluar el reconocimiento del anticuerpo hacia la variante epidémica GII.4 más reciente. En los resultados de ELISA, resumidos en la Tabla 5 y la Figura 13A, se encontró que ninguno de los mutantes, M1, M2 o M3, fue reconocido por el anticuerpo. Curiosamente, tanto el mutante doble, M4, como el mutante múltiple, M5, fueron reconocidos por el anticuerpo, confirmando que al menos R397 y D447 forman parte del epítipo reconocido por el anticuerpo 3C3G3. Estos resultados muestran que el sitio antigénico B (STT 393,394,395) no parece estar involucrado en la formación del epítipo 3C3G3, ya que M3 no fue reconocido por el MAb del 3C3G3. También es interesante que la variante epidémica posterior, GII.4 Sydney\_2012, no sea reconocida por el MAb aunque comparte los 11 residuos del epítipo predicho (Tabla 6). Esto indica que otros residuos no identificados en este estudio podrían estar implicados en la formación del epítipo 3C3G3.



**Figura 13.** Unión de diferentes anticuerpos a partículas P de tipo salvaje y mutantes analizadas por ELISA. (A) Reconocimiento por los anticuerpos P-PAb y 3C3G3. (B) Reconocimiento por anti-v0.8 y anti-v2.5 MAbs. Sólo se muestra la dilución 1/1.000 para mayor claridad. Las barras de error indican las desviaciones estándar de tres réplicas. La línea horizontal indica el valor de corte de la prueba ELISA.

Cepa norovirus (Variante)	Número de acceso	Año	Residuos aminoacídicos de VP1 (2006 b)										Sitio B antigénico 393-395	
			245	247	389	390	397	435	443	444	445	446		448
Epítipo 3C3G3			P	E	I	Q	R	R	G	Y	P	N	D	
GII.4 MD134-7 (<1996)	AY030098	1987	-	-	-	-	Q	-	-	-	-	-	N	D - H
GII.4 Bristi (<1996)	X76716	1993	-	-	-	-	Q	-	-	-	-	-	N	D - H
GII.4 Kaiso (<1996)	AB294779	2003	-	-	-	-	Q	-	-	-	-	-	N	D - R
GII.4 VA387 (1996)	AY038600.3	1998	-	-	-	-	Q	-	-	-	-	-	N	N - N
GII.4 004 95M-14 (1996)	AF080551	1995	-	-	-	-	Q	-	-	-	-	-	N	N - N
GII.4 Narita 104 (1996)	AB078336	2002	-	-	-	-	Q	-	-	-	-	-	N	N - N
GII.4 V0 (1999)		1999	-	-	-	-	Q	-	-	-	-	-	N	N - N
GII.4 Farmington Hills (2002)	AY502023	2002	-	-	V	-	Q	-	-	-	-	-	N	NGT
GII.4 Oxford B5S22 (2002)	AY581254	2003	-	-	V	-	Q	-	-	-	-	-	N	NGT
GII.4 Hunter 284E (2004)	DQ078794	2004	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	STT
GII.4 V2 (2004)		2004	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	STA
GII.4 Kimitsu (2004)	AB294784	2005	-	-	V	-	Q	-	-	-	-	-	N	STT
GII.4 Den Haag 54 (2004)	EF126962	2006	-	-	V	-	Q	-	-	-	-	-	N	STT
GII.4 Isumi 060936 (2006a)	AB294790	2006	-	-	V	-	Q	-	-	-	-	-	N	STT
GII.4 Yerseke 38 (2006a)	EF126963	2006	-	-	V	-	Q	-	-	-	-	-	N	STT
GII.4 Sakai (2006b)	AB220922	2005	-	-	-	-	Q	-	-	-	-	-	N	SSA
GII.4 NSW696T (2006b)	EF684915	2006	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	STT
GII.4 Den Haag (2006b)		2006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	STT
GII.4_Apeldoorn (2007)		2007	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NTA
GII.4 New Orleans (2009)	KR904211	2009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GTT
GII.4 Sydney (2012)	AGV76572.1	2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	STT

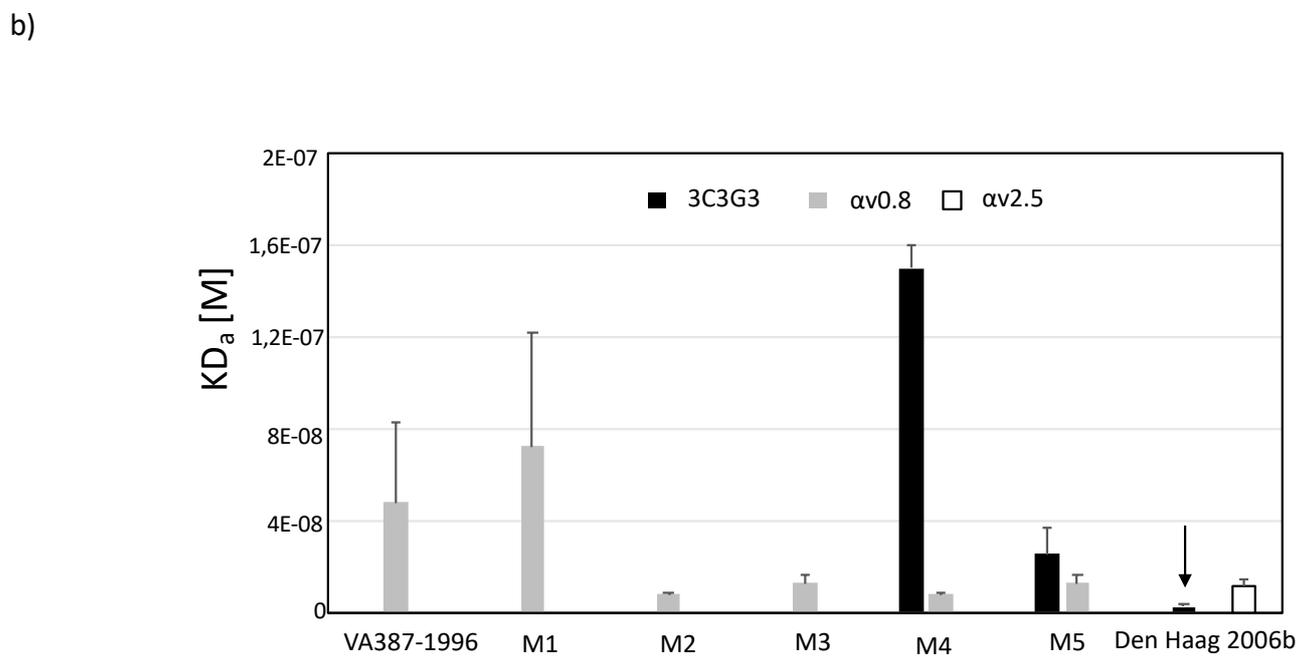
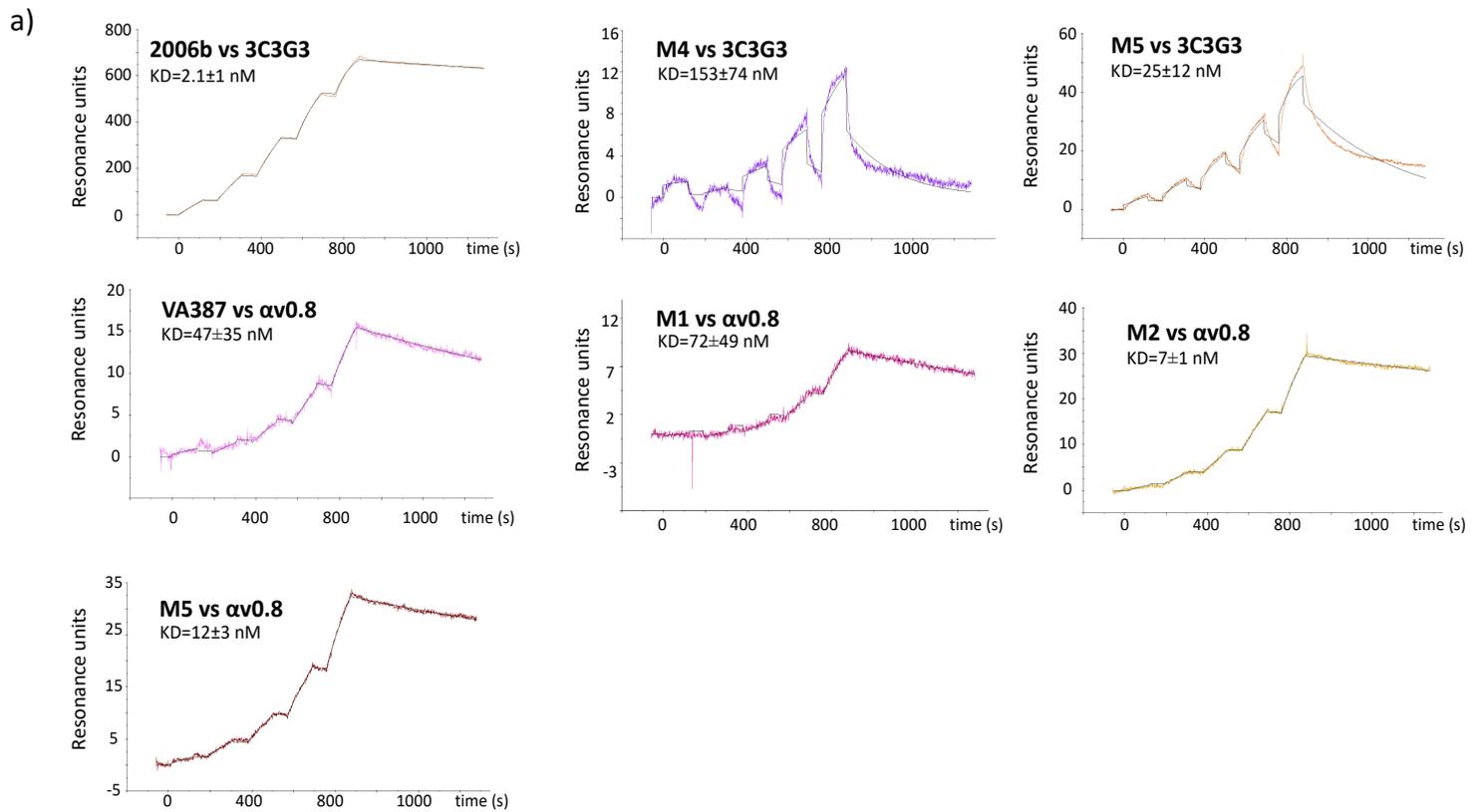
**Tabla 6.** Secuencias de epítipos 3C3G3 en diferentes variantes de norovirus GII.4.

Para determinar si este epítipo recién descrito afecta a la unión de otros anticuerpos dirigidos frente a GII.4, se ensayó también por ELISA la reactividad de los MAb anti-v0.8 y anti-v2.5 contra las diferentes partículas P. Los resultados muestran que el epítipo anti-v2.5 podría ser diferente del epítipo 3C3G3, ya que ninguno de los mutantes fue reconocido por el MAb (Figura 13B). Curiosamente, este anticuerpo también era independiente del sitio antigénico B descrito anteriormente, presente aquí en las construcciones M3 y M5 (Allen *et al.*, 2008). Por el contrario, el MAb anti-v0.8 reaccionó contra cada uno de los mutantes, aunque a diferentes niveles. Esto puede indicar que los residuos seleccionados influyen en el plegamiento del epítipo reconocido por el anticuerpo, ya que ambos residuos se conservan en las variantes VA387\_1996 y V0\_1999 (Tabla 6). Según nuestros resultados, este MAb mostró una

dependencia del sitio antigénico B, como se había descrito anteriormente (Allen *et al.*, 2008).

### **3.3.5. Caracterización del epítopo MAb 3C3G3 por resonancia superficial de plasmón (SPR)**

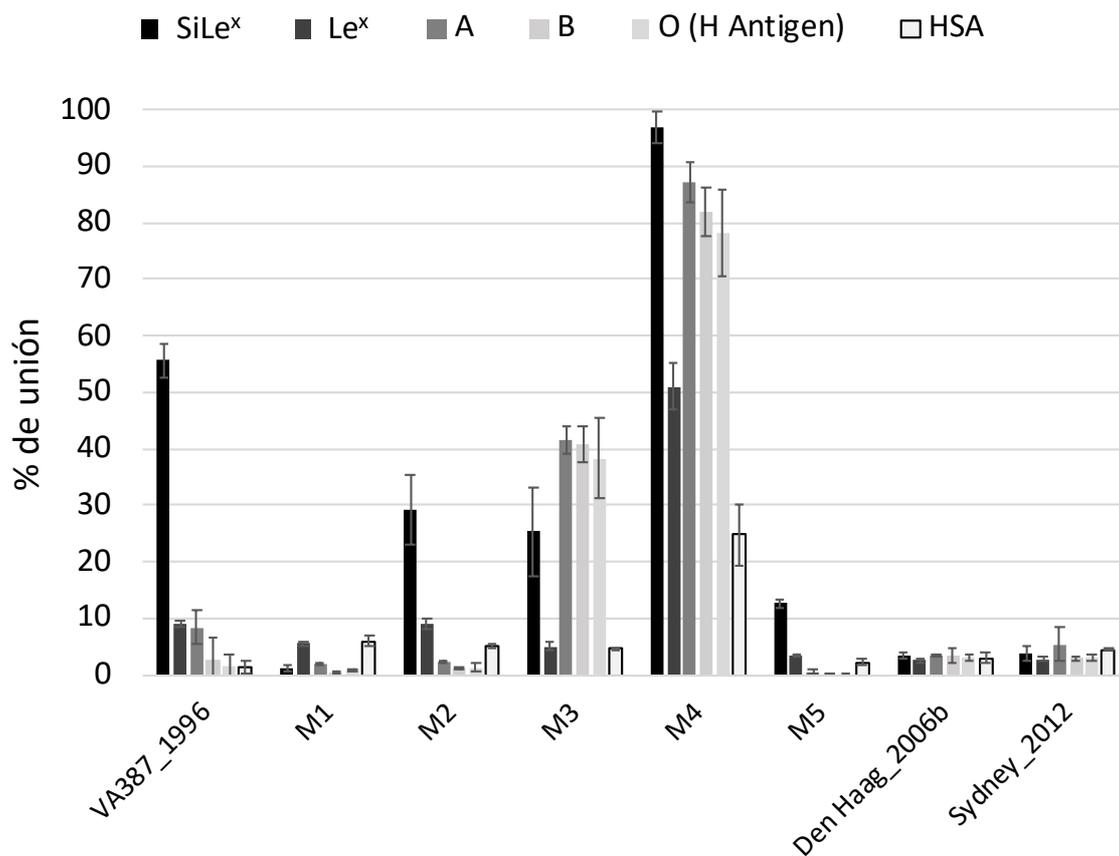
Para cuantificar la fuerza de la interacción entre los MAbs probados y las diferentes partículas P reconocidas, se aplicó un ensayo de SPR, y se obtuvieron constantes de afinidad ( $KD_a$ ) en al menos tres experimentos independientes. De todos los pares de interacción, la afinidad más alta (valor  $KD_a$  más bajo) se obtuvo en el par de interacción 3C3G3-GII4 Den Haag\_2006b (Tabla 5 y Figura 14). Aunque M4 dio una señal más intensa en ELISA (Figura 13A), los experimentos de SPR revelaron que el mutante M4 tenía una  $KD_a$  (153 nM) 6 veces mayor que la del mutante M5 (25 nM) (Tabla 5). Después de modelar las estructuras de los diferentes mutantes utilizando la estructura de dominio P del VA387\_1996 como andamio (PDB ID, 2OBR), observamos que los residuos R397 y D448 probablemente presentan diferentes conformaciones en M4 y M5 (Figura 9C y D). En el modelo M5, el carboxilato aniónico D448 ( $RCOO^-$ ) y el amonio catiónico R397 ( $RNH_3^+$ ) estaban más cerca. Esto aumentaría la posibilidad de formación de puentes salinos, lo que permitiría la estabilización del epítopo 3C3G3.



**Figura 14.** A) Sensogramas representativos de los experimentos de resonancia superficial de plasmón (SPR). Los pares de interacción se muestran en cada panel. B) Representación de las diferentes constantes de afinidad ( $KD_a$ ) en molar (M) obtenidas mediante los análisis por SPR. Las barras de error indican las desviaciones estándar de tres réplicas. La flecha indica el mejor par de interacción.

### **3.3.6. El residuo R397 está involucrado en el reconocimiento de HBGA**

La unión de las variantes VA387\_1996, Den Haag\_2006b y Sydney\_2012, así como de las cinco mutantes (M1 a M5), a cinco antígenos HBGA diferentes (SiLe<sup>x</sup>, Le<sup>x</sup>, grupo sanguíneo O [antígeno H], grupo sanguíneo A y grupo sanguíneo B) fue analizada para estudiar si los residuos involucrados en su inmunogenicidad también tuvieron un impacto en la unión de sus receptores. Nuestros resultados mostraron que hubo un cambio en el patrón de reconocimiento entre el VA387\_1996 y las variantes Den Haag\_2006b y Sydney\_2012. Mientras que la cepa VA387\_1996 poseía una gran capacidad para unirse al antígeno SiLe<sup>x</sup>, las variantes Den Haag\_2006b y Sydney\_2012 no reconocían ninguno de los antígenos ensayados (Figura 15). Curiosamente, M1, que incorpora la mutación única Q396R, perdió su capacidad de unirse a los HBGA probados, mostrando el mismo patrón de reconocimiento que las variantes 2006b y 2012. El mutante M2 mantuvo una unión con SiLe<sup>x</sup> similar a la del tipo salvaje VA387\_1996. M3 y M4 aumentaron su capacidad para reconocer los antígenos de los grupos sanguíneos A, B y O. Además, M4 reconoció la HSA no funcionalizada. Finalmente, el mutante M5 demostró una unión residual del 10% a SiLe<sup>x</sup>. Tal y como se muestra en la Tabla 6 dicho residuo se mantiene invariable a lo largo de las cepas anteriores a la aparición de la variante GII.4\_Den Haag 2006b en el cual se produce un cambio de Q397R lo que aportaría una explicación a la falta de reconocimiento por el MAb 3C3G3 de las variantes anteriores a ésta.



**Figura 15.** Porcentajes de unión de siete partículas de P diferentes (VA387\_1996, M1 a M5 y Den Haag\_2006b) a cinco antígenos HBGA diferentes (antígeno SiLe<sup>x</sup>, antígeno Le<sup>x</sup> y antígenos del grupo sanguíneo A, B y O H) determinados por ELISA. Cada unión de partículas P se normalizó con el valor más alto de OD<sub>492</sub>. Las barras de error indican las desviaciones estándar. Se usó la HSA como control.



### 3.4. Discusión

Debido a la relevancia de las variantes de escape a anticuerpos en la persistencia de norovirus GII.4 durante los últimos 40 años, decidimos resolver el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal 3C3G3, que es un anticuerpo capaz de bloquear la unión de norovirus a saliva. Los resultados del presente estudio arrojan luz sobre la forma en que norovirus escapa a la neutralización de anticuerpos. El anticuerpo no pudo reconocer ninguno de los antígenos analizados por Western blot, lo que indica que el epítipo diana debe ser conformacional. Por esta razón, se eligió el ensayo de “phage display”. De los 11 residuos sospechosos de formar parte del epítipo (ver resultados), dos, R397 y D448, fueron confirmados como parte del epítipo por mutagénesis dirigida de las partículas P de VA387\_1996. Cuando se produjeron diferentes partículas P, se observaron diferencias en su movilidad electroforética. Estas diferencias en la movilidad electroforética han sido previamente reportadas para la variante VA387 y se asociaron a la formación de partículas P (dímeros de P versus partículas P) (Tan & Jiang, 2005) lo que podría revelar cambios estructurales. En el presente estudio se confirmó que todas las partículas P diseñadas se construyeron con éxito, con masas moleculares estimadas entre 870 y 1.030 kDa.

Además de los residuos R397 y D448, otra diferencia entre las secuencias de VA387\_1996 y Den Haag\_2006b fue el cambio de aminoácidos 393 a 395 (STT en la variante Den Haag\_2006b y N-N en la variante VA387\_1996). Este cambio se incorporó en los mutantes M3 y M5, ya que se encontraban en las proximidades de R397. Anteriormente se había demostrado que formaban un epítipo importante en los norovirus GII.4 (Allen *et al.*, 2008). Sin embargo, estos

tres residuos no rescataron la capacidad de unión del anticuerpo 3C3G3 (M3 no fue reconocido por el 3C3G3), pero ayudaron a estabilizar el epítipo 3C3G3, ya que el 3C3G3 tenía 6 veces más afinidad por M5 que por M4. Después del modelado molecular de los 5 mutantes (Figura 12), podríamos predecir la formación de un puente salino entre R397 y D448 sólo en M5 y no en M4. Esto podría explicar la mayor estabilidad del epítipo 3C3G3 en M5, mientras que los residuos de STT 393 a 395 no parecían formar parte del epítipo 3C3G3 en sí.

Como se muestra en la Tabla 6, parece que los residuos R397 y D448 han sido importantes en las sucesivas variantes de GII.4. Para aclarar si son parte de epítopos reconocidos por otros MAbs producidos frente a diferentes variantes de GII.4, también caracterizamos dos MAbs previamente obtenidos, anti-v0.8 y anti-v2.5, que fueron probados contra los mismos antígenos y mutantes que el MAb 3C3G3. Mediante ELISA y SPR se confirmó que el MAb anti-v0.8 depende del sitio antigénico B (393 a 395, -NN a STT), como se describió anteriormente (Allen *et al.*, 2008). El epítipo reconocido por el anti-v0.8 también se vio afectado en los mutantes M1 y M2, indicando que los aminoácidos 397 y 448 también podrían estar implicados en la conformación del epítipo. Además, los resultados con los tres MAbs mostraron la existencia de reactividad cruzada sólo entre las variantes más cercanas y que ninguna de las variantes más distantes compartía reactividad (Tabla 5). El MAb anti-v2.5 reconoció sólo la partícula P más cercana correspondiente a la variante GII.4 Den Haag\_2006b. Todos los mutantes fueron hechos usando la variante VA387\_1996 como andamiaje, la cual no es reconocida por el anticuerpo. Sólo si R397 y D448 están presentes en su epítipo se recuperaría el reconocimiento por parte del anticuerpo. La única conclusión a

la que podemos llegar es que estos residuos podrían no formar parte del epítipo anti-v2.5 MAb. Estos resultados tienen implicaciones importantes desde un punto de vista evolutivo, ya que demuestran que los MAbs contra las variantes más antiguas no reconocen a las más nuevas. Esto explica por qué el mismo genotipo puede producir pandemias sucesivas. Además, el HPA-PAb es capaz de reconocer las VLPs de GI.1 pero no las partículas P de GI.1, apoyando la idea de que los epítopos de reacción cruzada entre los dos genogrupos están presentes sólo en el dominio S de VP1, que no está presente en las partículas P (Parra *et al.*, 2012).

Cuando se compararon los epítopos del 3C3G3 en varias variantes de norovirus GI.4 (Tabla 6), los dos residuos identificados en el presente estudio, R397 y D448, se conservaron siempre. Todas las variantes anteriores a 2004 poseían la combinación Q397-N448, y todas las variantes surgidas desde 2006 contienen el doblete R397-D448. Hubo un período de transición entre 2004 y 2006 en el que ambos dobletes estuvieron presentes, pero siempre en la misma combinación. En la estructura VA387\_1996 y en los modelos estructurales de la figura 12, se observó que estos dos aminoácidos estaban localizados muy cerca uno del otro, y en M5, parecían interactuar a través de un puente salino. Esta interacción física podría explicar por qué estos dos residuos se encuentran en combinaciones fijas a través de las diferentes variantes. Podríamos plantear la hipótesis de que los residuos podrían estar involucrados adicionalmente en la estabilización de la propia partícula P, no sólo en el epítipo del 3C3G3. De hecho, observamos cambios en la movilidad electroforética de las diferentes partículas de P cuando estos residuos fueron mutagenizados dentro de

VA387\_1996, M1 y M4, siendo las partículas P las más heterogéneas migrando. Sin embargo, las variantes Den Haag\_2006b y Sydney\_2012, que poseen el par R397-D448, junto con la versión 393 a 395 STT del sitio antigénico B (que favorece la formación del puente salino R397-D448), fueron más homogéneas que la variante 1996.

Se sabe que los norovirus GII.4 tienen patrones de reconocimiento de HBGA específicos de cepa (Debbink *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2010). Para evaluar si el epítipo 3C3G3 está involucrado en la interacción con los receptores, se analizó la unión de las diferentes partículas P GII.4 a varios HBGAs. Nuestros resultados indicaron que el cambio en R397 parecía ser la clave en los diferentes patrones de reconocimiento observados en las nuevas variantes de GII.4 en comparación con las antiguas. La conclusión a la que se llegó fue que este cambio podría haber tenido un efecto en el plegado del sitio de unión a la fucosa, que no está en contacto con este residuo (figura 12).

Curiosamente, el mutante M4 que incluye ambas sustituciones (Q396R y N447D) ha aumentado la capacidad de unión, incluyendo una alta unión a la HSA (control negativo). En la Tabla 6 se puede observar que esta combinación de aminoácidos (R396 y D447) siempre va acompañada del triplete del sitio antigénico B y no del doblete que está presente en M4. La combinación del doblete del sitio antigénico B con R396 y D447 no se ha encontrado hasta ahora en virus silvestres, lo que puede reflejar un proceso de selección negativo, probablemente debido a su deficiente unión, como se observa con el mutante M4.

Esta es la primera vez que se ha aplicado la técnica de “phage display” para estudiar los epítomos de norovirus GII.4. En estudios anteriores se utilizaron enfoques evolutivos y estructurales para identificar epítomos putativos, incluidos los sitios A (aminoácidos 296 a 298) y B (aminoácidos 393 a 395) (Allen *et al.*, 2008). Estos epítomos se confirmaron mediante quimeras entre diferentes variantes de GII.4 de norovirus y anticuerpos monoclonales. Un enfoque similar mostró que el sitio A debería estar formado por los aminoácidos 294, 368 y 372, además de 296 a 298 (Debbink *et al.*, 2013). También se ha demostrado que el epítomo B influye en los cambios en las capacidades de unión de los HBGA de diferentes variantes de GII.4 (Debbink *et al.*, 2013). Utilizando la técnica de “phage display”, hemos podido identificar 2 residuos (397 y 448) que no estaban tan expuestos como los epítomos descritos anteriormente, lo que dificulta la predicción de su relevancia tras el análisis estructural. Hemos demostrado que estos residuos desempeñan un papel importante en el reconocimiento de anticuerpos y en las interacciones con los HBGAs y que han evolucionado de variantes ancestrales a modernas.

En conjunto, hemos podido estudiar el epítomo reconocido por el anticuerpo 3C3G3 y hemos demostrado que este epítomo está implicado en las interacciones virus-hospedador. Por un lado, los dos aminoácidos R397 y D448 parecen estar implicados en la evasión de la respuesta de los anticuerpos del huésped, lo que demuestra cómo pequeños cambios en la secuencia de aminoácidos podrían aportar enormes beneficios al virus en términos de evasión de anticuerpos. Por otra parte, hemos demostrado que un solo cambio en la posición 396 de la variante de 1996 (397 en la variante 2006b) podría ser suficiente para modular la unión de norovirus a los HBGAs.



**4. Capítulo II: Descifrando la función del antígeno  
secretor en la adhesión de rotavirus humanos a  
los antígenos histo-sanguíneos**

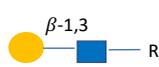
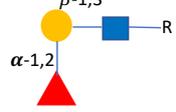
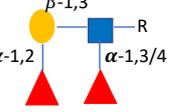
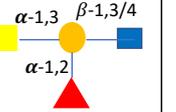
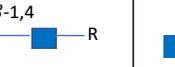


## 4.1. Introducción

Los rotavirus se encuentran entre los principales agentes etiológicos de la gastroenteritis vírica en lactantes y niños pequeños en todo el mundo y son responsables de unas 140.000 muertes al año en los países en desarrollo (Wang *et al.*, 2016). La clasificación de los rotavirus se basa en su composición genómica y de la reactividad inmunológica de tres proteínas estructurales: VP6, VP7 y VP4. Se clasifican en 9 grupos (A-I) según la reactividad inmunológica de la proteína de la capa intermedia, VP6, siendo los rotavirus del grupo A los que más frecuentemente producen infecciones en humanos (Matthijnssens *et al.*, 2012). Las dos proteínas de la cápside externa, VP7 y VP4, generan anticuerpos neutralizantes que pueden inducir protección. Utilizando estas dos proteínas se ha establecido un sistema de clasificación de los rotavirus del grupo A en serotipos/genotipos G (dependientes de la glicoproteína VP7) y P (dependientes de la proteína VP4 sensible a proteasas) (Buesa & Rodríguez-Díaz, 2007). Existen al menos 36 genotipos G y 51 genotipos P de rotavirus humanos y animales. Los genotipos G1[P8], G2[P4], G3[P8] y G4[P8] representan más del 90% de las cepas humanas de rotavirus que circulan en la mayoría de los países (Buesa & Rodríguez-Díaz, 2007), siendo de especial relevancia el genotipo P[8], que incluye cuatro linajes genéticos diferentes (I a IV) (Arista *et al.*, 2006; Bányai *et al.*, 2012).

Se han descrito diversas interacciones entre los antígenos histo-sanguíneos (HBGAs) y rotavirus. Se cree que los HBGAs expresados en la superficie de las células diana sirven como receptores virales. La porción distal VP8\* (~27 kDa, N-terminal) de la proteína VP4 de los genotipos P[8], P[4], P[6] y P[19] reconoce los HBGAs secretores. P[8] y P[4] están relacionados genéticamente y, según

algunos autores (Huang *et al.*, 2012), ambos se unen a los antígenos Lewis<sup>b</sup> (Fuc-  $\alpha$  1,2-Gal- $\beta$ 1,3-[Fuc- $\alpha$ 1,4-]GlcNAc; Le<sup>b</sup>) y H type-1 (H1) (Fuc-  $\alpha$  1,2-Gal- $\beta$ 1,3-GlcNAc) (Tabla 7) mientras que otros defienden que no se establece ningún tipo de unión de estos genotipos con Lewis<sup>b</sup> (Liu *et al.*, 2017). P[6], un genotipo ligeramente relacionado, se une al antígeno H1 pero no a Lewis<sup>b</sup> (Huang *et al.*, 2012), mientras que P[19] se une a los glicanos de mucina con un núcleo de GlcNAc- $\beta$ 1,6-GalNAc y al precursor de HBGA de tipo 1 (Liu *et al.*, 2016) (Tabla 7). Además, los genotipos P[9], P[14] y P[25] se unen específicamente a los antígenos de tipo A (GalNAc- $\alpha$ 1,3-[Fuc- $\alpha$ 1,2-]Gal) (Hu *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012), P[11] interacciona con la N-acetilactosamina (Gal- $\beta$ 1,4-GlcNAc; LacNAc), la cual constituye el precursor del glicano de tipo 2 (Liu *et al.*, 2013) (Tabla 7).

	Precursor tipo I Lacto-N-Biosa (LNB)	H tipo I	Le <sup>b</sup>	Antígeno tipo A	Precursor tipo II	Núcleo de la mucina
HBGAs						
Genotipo VP8	P[8] y P[19]	P[4], P[6] y P[8]	P[4] y P[8]*	P[9], P[14] y P[25]	P[11]	P[19]

**Tabla 7.** Resumen de las interacciones descritas entre los diferentes genotipos de VP8\* y los HBGAs. El asterisco indica que dicha interacción no se reproduce en todos los experimentos. Leyenda: ● galactosa; ■ N-acetilglucosamina (GlcNAc), ▲ fucosa y la ■ N- acetilgalactosamina.

Se han obtenido evidencias detalladas de las interacciones de VP8\*-HBGAs mediante cristalografía de rayos X de P[14] VP8\* y P[11] VP8\* en complejo con el oligosacárido de tipo A (Hu *et al.*, 2012) y LacNAc (Liu *et al.*, 2013), respectivamente. Recientemente, se ha resuelto la estructura de la VP8\* del genotipo P[19] porcino con la lacto-N-fucopentaosa I (Fuc- $\alpha$ 1,2-Gal- $\beta$ 1,3-GlcNAc- $\beta$ 1,3-Gal- $\beta$ 1,4-Glc; LNFPI), y con el glicano del núcleo de la mucina de tipo 2 (GlcNAc- $\beta$ 1,6-[Gal- $\beta$ 1,3]GalNAc). Con ello se muestra un sitio de unión de

carbohidratos alternativo al utilizado por P[11] y P[14] (Yang Liu *et al.*, 2017). Este sitio de unión fue sugerido por primera vez por análisis de secuencias de proteínas en otros miembros del genogrupo de rotavirus P[II] (es decir, genotipos P[4], P[6], P[8]) (Liu *et al.*, 2017) y recientemente se ha confirmado para P[4] y P[6] (Hu *et al.*, 2018). Sin embargo, se desconoce por qué los individuos que no son secretores (que carecen de fucosilación  $\alpha$ -1,2 en las estructuras de los HBGAs) poseen una menor susceptibilidad a las infecciones por rotavirus (Kazi *et al.*, 2017; Nordgren *et al.*, 2014) y cuál es la función de la L-fucosa en el reconocimiento del ligando H1 para el rotavirus humano más importante, ya que todavía no se dispone de una estructura para el genotipo P[8] en complejo con los HBGA.

Mediante el uso de VP8\* de un aislado clínico perteneciente al linaje [III] de P[8], en el presente trabajo demostramos que P[8] se une al antígeno H1 en un sitio similar al que se unen los genotipos P[19], P[4] y P[6]. Nuestros resultados estructurales y funcionales también demuestran que el precursor H1, lacto-N-biosa (Gal- $\beta$  1,3-GlcNAc; LNB), desprovista de L-fucosa, también interactúa con la proteína VP8\*, y descartamos los antígenos Lewis<sup>a</sup> o Lewis<sup>b</sup> como ligandos del genotipo P[8]. Proporcionamos las bases moleculares para la función del antígeno secretor en la unión del rotavirus a su receptor. Nuestros resultados muestran un aumento del doble de la afinidad por el antígeno H1 en comparación con la LNB. Este aumento se explica por la reducción de los contactos de la L-fucosa con las moléculas de disolvente y la estabilización estructural de la fracción LNB en la conformación adecuada para la unión. Además, mostramos cómo las sutiles diferencias en el sitio de unión H1/LNB en diferentes linajes de P[8] influyen en las afinidades de los antígenos, dando especial relevancia a la

glicobiología del huésped en las infecciones por rotavirus del genotipo P[8] en los seres humanos. El efecto parcial de la LNB como anti-adhesina frente a rotavirus que se muestra en el presente artículo y los conocimientos adquiridos sobre la interacción entre rotavirus y las células huésped durante la adhesión del virus podrían abrir nuevas vías para el tratamiento y la prevención de las infecciones por rotavirus.

## 4.2. Material y métodos

### 4.2.1. Expresión y purificación de las proteínas VP8\* de rotavirus

Las secuencias génicas codificantes de las proteínas VP8\* (aminoácidos 64-224 de la proteína VP4 de rotavirus) pertenecientes a los genotipos P[4], P[6], P[8], P[9], P[11], P[14] y P[25] se clonaron en el vector de expresión pGEX-2T (GE Healthcare) con el fin de expresarlas como fusiones a GST en su extremo N terminal.

Para amplificar la región codificante de los genotipos P[4], P[6], P[8], P[9] y P[14], se extrajo el RNA a partir de muestras de heces de pacientes con infección por rotavirus (diagnosticadas en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia) que contenían rotavirus de genotipo P conocido, utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) y siguiendo el procedimiento estándar. El RNA viral se transcribió usando la transcriptasa inversa SuperScript (Invitrogen) con cebadores aleatorios, y el cDNA generado se amplificó por PCR usando la Pfu polimerasa (Stratagene) con los cebadores que se detallan en la Tabla 8. Los cDNAs se clonaron en el vector pGEX-2T (GE healthcare) tras la digestión con *Bam*HI (ThermoFisher). Los diferentes clones de VP8\*::GST se expresaron en *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen), cultivado a 37°C en agitación hasta un OD<sub>600</sub>= 0.5 en medio LB suplementado con ampicilina y kanamicina (concentración final 100 µg/ml y 25 µg/ml respectivamente). Tras esto se indujeron los cultivos con IPTG a una concentración final de 0.1 mM. Los cultivos se mantuvieron a 25°C durante la noche. Después de la inducción, las células se recuperaron por centrifugación a 5.000 x g durante 20 minutos. Las células procedentes de 1 l de cultivo se lisaron en 15 ml de tampón de lisis [(PBS con 0.5% de cóctel inhibidor de proteasas (Sigma), lisozima 1 mg/ml, 125 U DNAsa I (Thermo Fischer

Scientific) y 0.5 mM DTT]. Los lisados se centrifugaron a 15.000 x g durante 30 minutos y se filtraron los sobrenadantes a través de filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore). Para purificar las proteínas se utilizó un sistema FPLC Äkta prime (GE. Healthcare) con una columna GST-Trap (GE. Healthcare) en PBS. El tampón de elución consistía en 50 mM Tris-HCl, 10 mM glutatión, pH 8.0. Las proteínas VP8\* fueron dializadas utilizando una columna de HiTrap desalting (GE. Healthcare) en el mismo sistema Äkta prime FPLC.

Los genes VP8\* de los genotipos P[4], P[11] y P[25] se adquirieron como genes sintéticos de Gene-ART (ThermoFischer). El nivel de expresión de la proteína P[4]-VP8\* en *E. coli* de la muestra clínica fue muy bajo, por lo que se optimizó el uso de codones en el gen sintético. P[11] VP8\* y P[25] VP8\* no estaban disponibles de muestras clínicas.

Nombre cebador	Secuencia 5'→3'
VP8_P4_FWD	TACAGT <u>GGATCC</u> GTTTTAGATGGTCCTTATCAA
VP8_P4_REV	ATCTATTATAAACCAATTATTGATATATTCA
VP8_P6_FWD	ACAATAG <u>GGATCC</u> GTA CTGATGGTCCTTATCAA
VP8_P6_REV	CTATTACAATCCAGTATTTATATATT
VP8_P8_FWD	ACAGTAGGATCCATGTTAGATGGTCCTTATCAG
VP8_P8_REV	CTATTACAGACCATTATTAATATATTCA
VP8_P9_FWD	CTAGTGGGATCCACTCTTGATGGTCCATATCAA
VP8_P9_REV	TTCTGAATCTATTATAAACCAATTATTTATATATT
VP8_P14_FWD	TTAGTTGGATCCACATTAGATGGACCATATCAA
VP8_P14_REV	CTATTAGAGCCCATTATTTATATACT
VP8_P8_W113A_FWD	TGGAAGAATAGCGACATTTTCATGGT
VP8_P8_W113A_REV	ACCATGAAATGTCGCTATTCTTCCA
VP8_P8_R148A_FWD	ATTATCCAGCGTCTCAAGAGTCTAA
VP8_P8_R148A_REV	TTAGACTCTTGAGACGCTGGAATAAT
VP8_P8_E151A_FWD	AAGGTCTCAAGCGTCTAAGTGTAAT
VP8_P8_E151A_REV	ATTACACTTAGACGCTTGAGACCTT
VP8_P8_I112V_FWD	ATATGGTGGAAAGAGTATGGACATTTTCAT
VP8_P8_I112V_REV	ATGAAATGTCCATACTCTTCCACCATAT

**Tabla 8.** Secuencias de cebadores utilizados en el presente trabajo. El sitio de restricción *Bam*HI está subrayado.

#### **4.2.2. Mutagénesis dirigida**

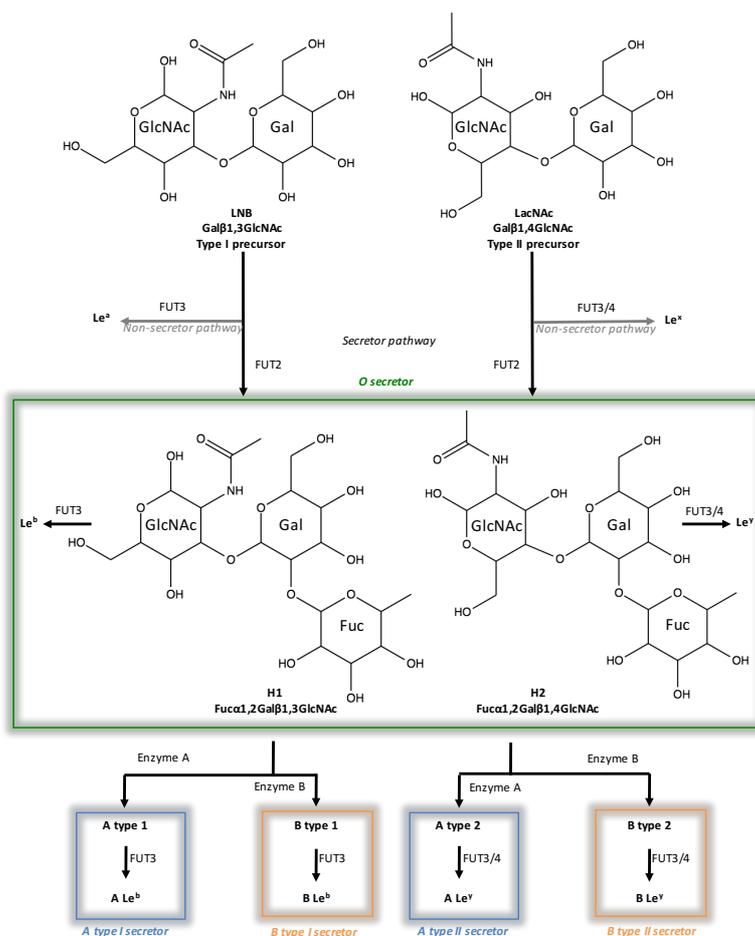
Los residuos seleccionados en la proteína VP8\*P[8]::GST se sustituyeron por alanina o valina según los datos estructurales del sitio de unión a la LNB. Se construyeron cuatro mutantes (M1-M4) utilizando un kit de mutagénesis dirigida (Stratagene) y los oligonucleótidos apropiados (Tabla 8). Los cambios en el DNA se confirmaron mediante secuenciación. Los mutantes M1, M2 y M3 contenían cambios en los codones de triptófano 174, arginina 209 y glutámico 212, respectivamente, en cada posición se introdujo una alanina. El mutante M4 sustituyó una isoleucina 173 por una valina.

#### **4.2.3. Ensayos de unión de VP8\* a glicanos**

Se utilizó un panel de oligosacáridos biotinilados incluyendo Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, Le<sup>c</sup> (lacto-N-biosa; LNB), H tipo 1, H tipo 2 y trisacáridos de grupo sanguíneo A y B adquiridos de Glycoz (Figura 15 y Tabla 9). Estos glicanos son neogliconjugados biotinilados con una cola poli [N-(2-hidroxietil-acrilamida)] (PAA) y con un tamaño de 30 a 50 KDa. Esto forma un polímero flexible para la presentación multivalente de los glicanos. Se recubrieron placas opacas (Nunc) con estreptavidina inmovilizada con los oligosacáridos biotinilados (2 µg/ml) en agua mili-Q y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de la funcionalización, se lavaron las placas una vez con PBS con 0,05% Tween 20 (PBS-T) y se añadieron las proteínas VP8\* (10 µg/ml) incubándolas a 4°C durante la noche. Después de tres lavados con PBS-T, se añadió un anticuerpo policlonal de conejo anti-GST (1:1.000) (Abcam) y se mantuvieron una hora a 37°C. A continuación, se lavó tres veces con PBS-T y se añadió un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) a una

dilución 1:10.000 durante 1 hora a 37°C. Después de tres lavados con PBS-T, la unión se detectó utilizando el kit QuantaBlue (ThermoFisher), tal y como recomienda el fabricante. Las unidades de fluorescencia se registraron con un lector de microplacas MultiScan (ThermoFisher). Todos los ensayos de unión se realizaron por triplicado.

La unión EC50 de la VP8\* de los genotipos clínicos (P[8]c) y cultivable (P[8]Wa) al tipo H-1 y a su precursor (LNB, Le<sup>c</sup>) se determinó incubando diluciones seriadas 1/2 de las proteínas VP8\*, empezando en 100 µg/ml hasta 1,5 µg/ml. Los ensayos de unión se realizaron por triplicado utilizando el protocolo descrito anteriormente.



**Figura 15.** Estructura y representación esquemática de las vías biosintéticas de los antígenos histo-sanguíneos tipo 1 y 2 (HBGA).

Oligosacárido	Estructura
Lewis <sup>a</sup> , Le <sup>a</sup>	Galβ1,3(Fuca1,4)GlcNAcβ-sp3-PAA-biot
Lewis <sup>c</sup> , Le <sup>c</sup> , LNB	Galβ1,3GlcNAcβ-sp3-PAA-biot
H type 2, H2	Fuca1,2Galβ1,4GlcNAcβ-sp3-PAA-biot
H type 1, H1	Fuca1,2Galβ1,3GlcNAcβ-sp3-PAA-biot
A trisaccharide, A <sub>tri</sub>	GalNAcα1,3(Fuca1,2)Galβ-sp3-PAA-biot
B trisaccharide	Gala1,3(Fuca1,2)Galβ-sp3-PAA-biot
Lewis <sup>b</sup> , Le <sup>b</sup>	Fuca1,2Galβ1,3(Fuca1,4)GlcNAcβ-sp3-PAA-biot

**Tabla 9.** Oligosacáridos biotinilados utilizados en el presente estudio. Todos los oligosacáridos biotinilados se adquirieron de Glyconz.

#### 4.2.4. Ensayos de bloqueo de unión

Para confirmar la unión de VP8\* del genotipo P[8] a la LNB, precursor del antígeno H tipo 1, se realizó un ensayo de bloqueo utilizando LNB soluble y su correspondiente disacárido galacto-N-biosa (Gal-β-1,3-GalNAc; GNB) producido y purificado en nuestro laboratorio como se describe en (Bidart *et al.*, 2014).

Las placas de microtitulación de estreptavidina se recubieron con el antígeno H tipo 1 biotinilado o LNB a 2 µg/ml con agua, se incubaron durante 1 hora a 37°C y posteriormente durante la noche a 4°C. Los ensayos de bloqueo se realizaron en paralelo utilizando tubos de vidrio que contenían la proteína P[8]c y P[8]Wa VP8\* en su concentración EC50 para cada ligando y 20 mM de cada uno de los disacáridos solubles (LNB y GNB) y monosacáridos (D-galactosa, GlcNAc y GalNAc). Se incluyó también un control positivo sin azúcar. Los tubos que contenían las mezclas de VP8\* con los azúcares se mantuvieron 1 hora a 37°C, seguidos de una incubación durante la noche a 4°C. Al día siguiente las placas de estreptavidina se lavaron con PBS-T, se añadieron las soluciones de azúcar y VP8\*s y se incubaron durante 4 horas a 4°C. Tras 4 horas de incubación se

lavaron tres veces con PBS-T y se detectaron las interacciones como se ha descrito anteriormente. Los resultados se presentan como el porcentaje de unión de cada condición en comparación con la unión del control positivo (sin bloquear con el azúcar). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

#### **4.2.5. Producción de partículas completas de rotavirus**

Se utilizaron células epiteliales de riñón de mono verde africano (línea celular MA104; ATTC #CRL-2378.1) para la propagación de la cepa Wa de rotavirus que pertenece al genotipo humano dominante G1P[8]. Se infectaron diez frascos de 150 cm<sup>2</sup> de células MA104 confluentes (aproximadamente  $1,5 \times 10^7$  células/frasco) con la cepa Wa a una multiplicidad de infección (MOI)  $\leq 0,1$  (Arnold *et al.*, 2009). Se obtuvieron 100 ml de medio con  $1,5 \times 10^8$  virus/ml y las partículas virales se concentraron por ultracentrifugación a  $160.000 \times g$  durante 1 h a 4°C en un rotor SW 41 (Beckman). El sedimento fue resuspendido en tampón TNC (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) para partículas de triple capa (TLP) o en TNE (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) para partículas de doble capa (DLP).

#### **4.2.6. Ensayos de unión del rotavirus de triple capa (TLP) y de partículas de doble capa (DLP) con glicanos**

Se empleó un ensayo de unión tipo ELISA para determinar la capacidad de unión de las TLP y DLP de rotavirus al antígeno H tipo 1 y a su precursor LNB. Se recubrieron las placas de estreptavidina con los oligosacáridos biotinilados como se ha descrito anteriormente. Después de lavar con PBS-T, se agregaron las diluciones seriadas de TLPs y DLPs (desde 10  $\mu\text{g/ml}$  hasta 0.078  $\mu\text{g/ml}$ ). Las

TLPs se mantenían siempre en TNC-T (20 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween 20, pH 7,4) y tanto los pasos de unión como los de lavado se realizaron en esta solución. Los ensayos de DLPs se realizaron en solución salina Tris con Tween 20 (TBS-T, 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,4). Las TLPs y DLPs se incubaron durante la noche a 4°C. Después de la unión, las placas se lavaron tres veces en TNC-T (para TLP) o TBS-T (para DLP) con un 0,05% de Tween 20 (TNC-T y TBS-T), se añadió un anticuerpo anti-VP6 de ratón a 1:100 en TNC-T o TBS-T y se incubaron durante 1 h a 37°C. A continuación, las placas se lavaron de nuevo tres veces con TNC-T o TBS-T, se añadió una IgG anti-ratón conjugada con HRP a 1:10.000 y se incubó a 37°C durante 1 hora. Después de los tres lavados finales, el reactivo QuantaBlue (ThermoFisher) reveló la unión siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las unidades de fluorescencia fueron registradas por un lector de microplacas MultiScan.

#### **4.2.7. Bloqueo de la infección por rotavirus en las células MA104**

La cepa G1P[8] Wa fue replicada en células MA104. Se utilizaron los azúcares LNB, GNB, GlcNAc, GalNAc, D-galactosa y L-fucosa para determinar su efecto sobre la infectividad de rotavirus. Los oligosacáridos se esterilizaron previamente a 99°C durante 10 minutos y luego se disolvieron en DMEM libre de suero que contenía 1 µg/ml de tripsina. En cada experimento se utilizó como control el DMEM libre de suero que contenía 1 µg/ml de tripsina sin oligosacáridos.

El efecto de diferentes monosacáridos y disacáridos sobre la infectividad de rotavirus se evaluó mediante ensayos de focos de fluorescencia en células MA104 (Arnold *et al.*, 2009). La dilución del virus Wa que produjo ~150

unidades/pocillo de focos fluorescentes se estableció como dilución de infección. Luego se añadieron azúcares durante la inoculación del virus a una concentración final de 5 mg/ml, se incubaron durante 1 hora y el virus no ligado se eliminó mediante lavado con FBS-DMEM (1% Suero bovino fetal- DMEM). Se mantuvo la infección durante 16 horas, tras esto se lavaron una vez con PBS y se fijaron con metanol al 100%. Se agregó un anticuerpo primario de ratón anti-VP6 (dilución 1:50 en PBS con 3% de BSA) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con una rotación suave. Tras la adición de un anticuerpo secundario anti- IgG de ratón conjugado con FITC (Sigma F4143) diluido 1:128 en PBS con un contenido de BSA del 3% se mantuvo durante 30 minutos a temperatura ambiente con una rotación suave. Los focos de fluorescencia individuales se contaron con un microscopio de fluorescencia invertida con un filtro compatible con FITC. La infectividad en ausencia de oligosacáridos sirvió como control. Cada condición experimental fue ensayada un mínimo de 2 veces, con triplicados para cada oligosacárido. Se representaron las medias y la SD de un mínimo de 6 determinaciones para cada condición. Se consideró que el título del virus medido en ausencia de oligosacáridos era 100% infeccioso, y los cambios en el título del virus en presencia de azúcares se expresaron como porcentaje de infectividad en comparación con el tratamiento sin azúcar.

#### **4.2.8. Análisis de resonancia superficial de plasmón (SPR)**

Los ensayos de afinidad se basaron en SPR y se realizaron en un instrumento Biacore T100 (GE Healthcare). Los azúcares H1 PAA-biotina y LNB PAA-biotina se diluyeron a una concentración de 1 mg/ml en agua y se capturaron con la estreptavidina en un chip SA (GE Healthcare). H1 se inmovilizó en el canal 2

(630 RU) del chip y LNB se inmovilizó en el canal 4 (624 RU). Los canales 1 y 3 se utilizaron como superficies de referencia para los canales 2 y 4, respectivamente. El proceso de inmovilización se realizó acondicionando la superficie del chip con tres inyecciones consecutivas de 1 minuto de NaCl 1M, 50mM NaOH antes de inmovilizar los ligandos biotinilados a una velocidad de flujo de 15  $\mu$ l/min. Los ensayos de afinidad se realizaron a 10°C utilizando 1X tampón HBS-EP<sup>+</sup>(0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20), a un flujo de 5  $\mu$ l/min con 2700 segundos de tiempo de contacto y un tiempo de disociación de 1800 segundos. El paso de regeneración consistió en un paso de lavado con 10 mM glicina-HCl pH 2 durante 20 segundos con el mismo flujo. Los ensayos se realizaron con la VP8\* purificada a diferentes concentraciones (45; 137; 411; 1.234; 3.703; 11.111; 33.333; 100.000 y 200.000 nM). Cada experimento incluía tres ciclos sin muestra. Los datos de afinidad se obtuvieron tras el análisis de los sensogramas obtenidos con el software BIAevaluation 2.0 (GE Healthcare). Dado que los oligosacáridos se inmovilizan en la superficie de un chip de forma multivalente pueden producirse efectos de avidéz y re-unión, por lo que el valor que se obtiene corresponde a constantes de afinidad aparentes ( $KD_a$ ). Los valores de  $KD_a$  se obtuvieron a partir del experimento cinético en equilibrio, ya que se utiliza la concentración de ligandos óptima para lograr una unión máxima en el equilibrio. Los experimentos se hicieron por triplicado. La representación gráfica de las curvas de señal/concentración se obtuvo usando GraphPad Prism 6 para MacOSX.

#### 4.2.9. Cristalización y recogida de datos

Los cristales se obtuvieron con la técnica de las gotas colgantes a 21°C mediante difusión de vapor. Los ensayos iniciales de cristalización se realizaron en el servicio de cristalografía del IBV-CSIC utilizando los paneles comerciales JBS I, II (JENA Biosciences) y JCSG+ (Molecular Dimensions) en placas de 96 pocillos. Las gotas de cristalización se generaron mezclando volúmenes iguales (0.3 µl) de la solución de proteína P[8]c y la solución de reservorio correspondiente, y se equilibraron con 100 µl de la solución de reservorio. Ambas estructuras de P[8]c Apo fueron cristalizadas a 10 mg/ml. VP8\* Apo1 se cristalizó en una solución reservorio de 1,2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3% isopropanol y 0,1 citrato de sodio pH 4,6, mientras que VP8\* Apo2 se cristalizó en 1,5 M Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 0,1 M Tris-HCl pH 6,5. En ambos casos se utilizó 2 M Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para crioproteger el cristal durante su congelación en nitrógeno líquido. Para la cristalización en presencia de glicanos, los ligandos se mezclaron con la proteína a una concentración final de 10 mM de ligando y 10 mg/ml de proteína. P[8]c VP8\* con LNB se cristalizó en una solución de depósito que consistía en 25% de PEG 3.350 0,1 M Bis-Tris pH 5,5. La criosolución utilizada para la congelación de cristales fue la solución de su reservorio aumentando hasta un 35% el PEG 3.350. P[8]c VP8\* con H1 se cristalizó con una solución de reservorio que consistía en 25% de PEG 6,000, 0.1 M Na-HEPES pH 7.5, 0.1 M LiCl, y PEG 6,000 que se incrementó hasta 35% para crioprotección. Se realizó difracción de rayos X a 100K en los sincrotrones Alba (Cerdanyola, Barcelona, España) y DLS (Didcot, Reino Unido) y se recogieron los mejores conjuntos de datos utilizados para resolver las estructuras en las líneas de haz y longitudes de onda indicadas (Tabla 9). Los datos de difracción se procesaron y redujeron con los programas Mosflm (Battye

*et al.*, 2011) y Aimless (Evans *et al.*, 2013) de la suite CCP(Winn *et al.*, 2011).

Las estadísticas de los datos utilizados en la determinación de la estructura se muestran en la Tabla 10.

	P[8] <sub>c</sub> VP8* Apo1	P[8] <sub>c</sub> VP8* Apo2	P[8] <sub>c</sub> VP8* LNB	P[8] <sub>c</sub> VP8* H1
<b>Data Collection</b>				
Beamline	ALBA-XALOC	ALBA-XALOC	ALBA-XALOC	ALBA-XALOC
Wavelength (Å)	0.97910	0.97907	0.97923	0.97928
Space group	P3 <sub>2</sub> 2	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>
Cell dimensions (Å)	a = b = 76.15 c = 70.08 α = γ = 90 β = 120	a = 53.35 b = 77.74 c = 104.01 α = β = γ = 90	a = 38.99 b = 54.72 c = 67.43 α = γ = 90 β = 97.92	a = 38.74 b = 54.64 c = 67.94 α = γ = 90 β = 97.73
Resolution (Å)	65.95–1.35 (1.39–1.35) <sup>a</sup>	104.01–1.51 (1.59–1.51)	54.72–1.31 (1.38–1.31)	54.64–1.85 (1.95–1.85)
Total reflections	524841 (27293)	483220 (61018)	220889 (26591)	85661 (12054)
Unique reflections	52269 (5152)	68175 (9712)	64030 (9582)	23811 (3447)
Completeness (%)	99.92 (99.34)	99.8 (98.9)	94.9 (97.6)	99.2 (98.9)
Multiplicity	10.0 (5.3)	7.1 (6.3)	3.4 (2.8)	3.6 (3.5)
Mean I/σ(I)	15.98 (1.48)	10.2 (2.3)	8.4 (1.7)	9.5 (1.9)
R <sub>pim</sub>	0.021 (0.266)	0.051 (0.425)	0.053 (0.419)	0.053 (0.431)
CC 1/2	0.999 (0.932)	0.996 (0.802)	0.995 (0.739)	0.997 (0.746)
<b>Refinement</b>				
R <sub>work</sub>	0.206	0.171	0.180	0.176
R <sub>free</sub>	0.227	0.204	0.209	0.232
Number of atoms	1564	3202	3204	2819
Protein	1312	2649	2652	2604
Water	211	524	512	179
Others	41	29	40	36
Rmsd, bonds (Å)	0.032	0.022	0.022	0.016
Rmsd, angles (°)	2.703	2.224	2.105	1.717
<b>Ramachandran plot</b>				
Preferred (%)	94.77	97.04	97.41	95.91
Allowed (%)	4.58	2.96	2.59	3.77
Outliers (%)	0.65	0	0	0.31

<sup>a</sup>Numbers in parentheses indicate values for the highest-resolution cell.

**Tabla 10.** Valores y estadísticos de recopilación y perfeccionamiento de datos.

#### 4.2.10. Construcción de modelos

La estructura P[8]<sub>c</sub> VP8\* Apo1 se resolvió mediante sustitución molecular realizada con el programa Phaser (McCoy *et al.*, 2007) y utilizando como modelo la estructura VP8\* del rotavirus porcino CRW-8 (PDB 2I2S) (Blanchard *et al.*, 2007). Las fases iniciales del reemplazo molecular se utilizaron para construir manualmente la estructura P[8]<sub>c</sub> VP8\* con Coot (Emsley *et al.*, 2010). La estructura Apo1 de P[8]<sub>c</sub> VP8\* se utilizó como modelo de reemplazo molecular para resolver las estructuras P[8]<sub>c</sub> VP8\* Apo2, P[8]<sub>c</sub> VP8\*LNB y P[8]<sub>c</sub> VP8\*H1.

Todos los modelos finales fueron generados por ciclos iterativos de refinamiento usando Refmac (Vagin *et al.*, 2004) y optimización manual con Coot. En la tabla 9 se presentan estadísticas sobre el perfeccionamiento de los datos. Los cristales mostraron buenos parámetros de control de calidad y una excelente estereoquímica. Las coordenadas atómicas y los factores de estructura se han depositado en el Banco de Datos de Proteínas (PDB) con los números de identificación 6H9W, 6H9Z, 6H9Y y 6HA0 para P[8]c VP8\* Apo1, P[8]c VP8\* Apo2, P[8]c VP8\*LNB y P[8]c VP8\*H1, respectivamente. Los cálculos de superposición de estructuras y RMSD se realizaron con Superpose (Krissinel & Henrick, 2004) de la suite CCP4.

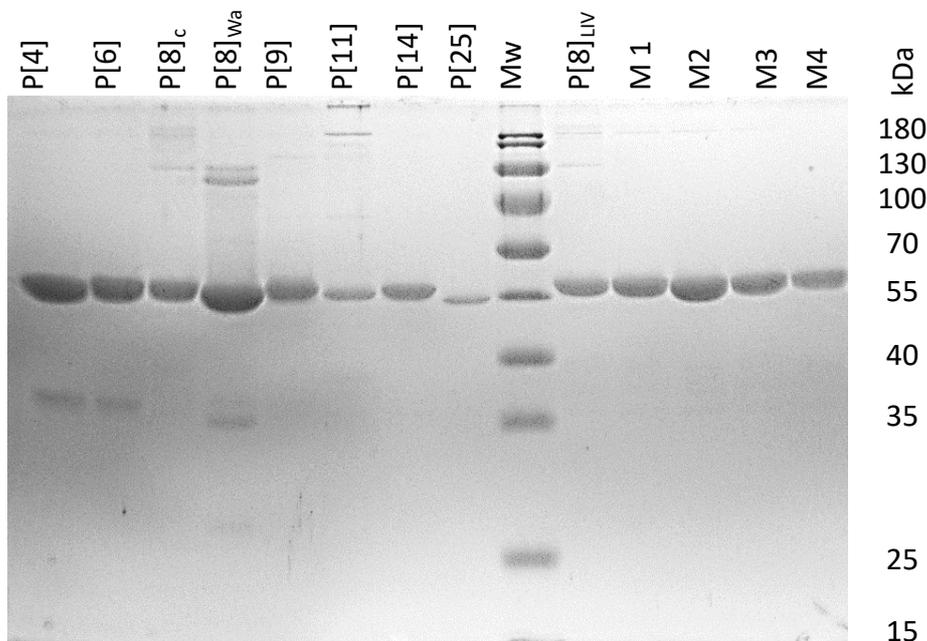
#### **4.2.11. Análisis estadístico**

Para evaluar las diferencias estadísticas en los experimentos de unión formato ELISA en los que se compararon muchos grupos, se realizó una prueba ANOVA. Para analizar las diferencias estadísticas en los valores de  $KD_a$  obtenidos por SPR se aplicó una prueba t no pareada. Todos los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism versión 6.0 para MacOSx (GraphPad Software). Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

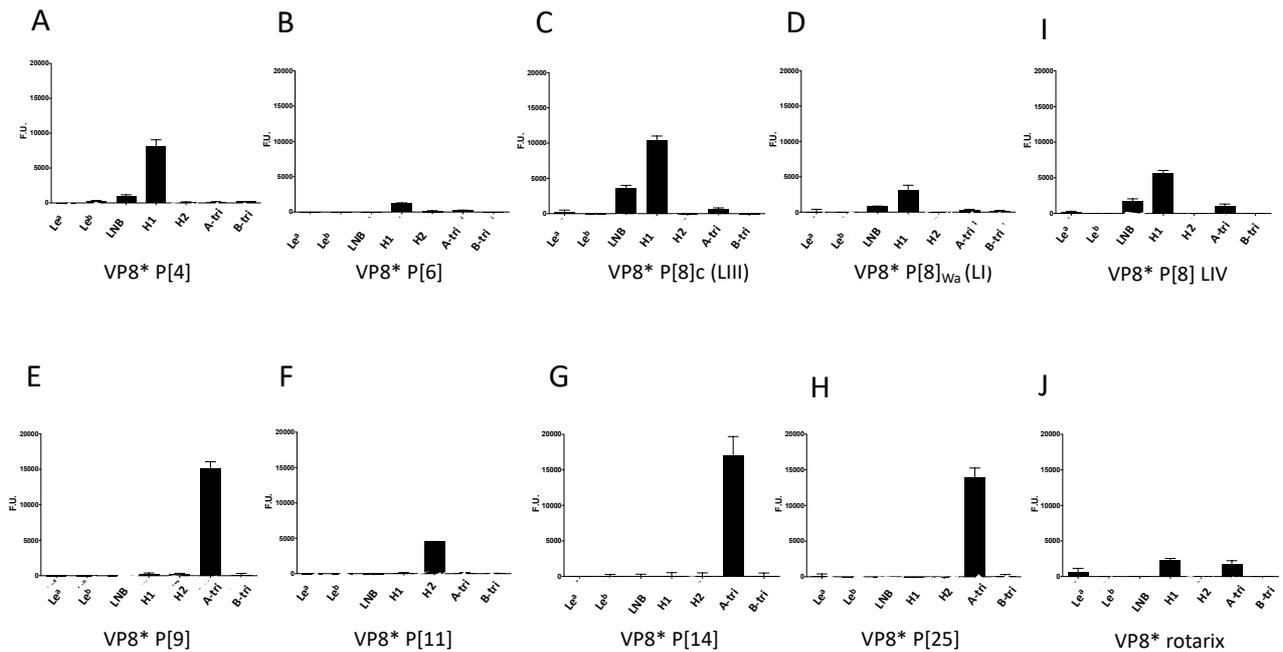
### 4.3. Resultados

#### 4.3.1. El dominio VP8\* de rotavirus del genotipo P[8] reconoce lacto-N-biosa, el precursor del antígeno H tipo-1

Se produjeron los dominios VP8\* de los genotipos P[4], P[6], P[9], P[11], P[14], P[25] y de diferentes linajes genéticos (I, III y IV) del genotipo P[8] (Figura 16). Para confirmar su funcionalidad, las diferentes proteínas se analizaron mediante ELISA contra un panel de antígenos histo-sanguíneos (HBGAs) biotinilados, corroborando las interacciones previamente descritas (Figura 17).



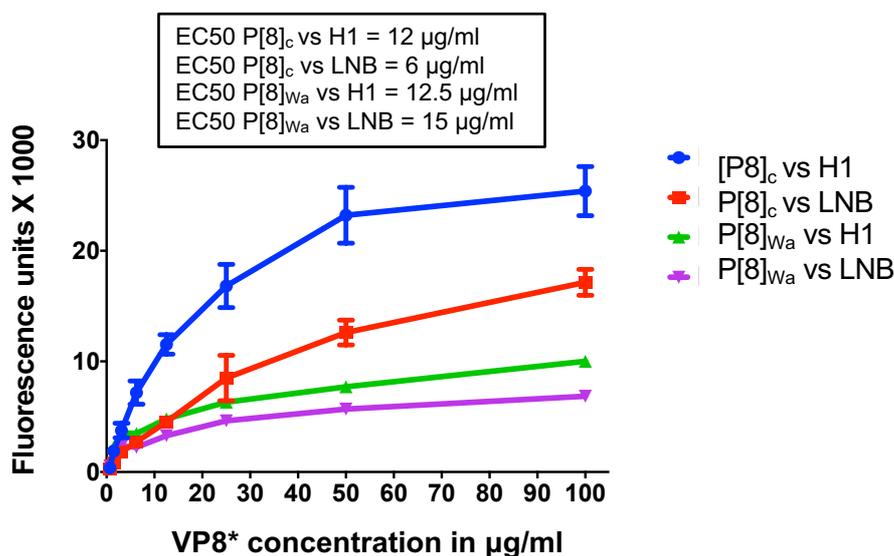
**Figura 16.** Gel SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie que muestra las diferentes proteínas GST::VP8\* utilizadas en el presente estudio. Se indica el genotipo de cada una de las proteínas así como el marcador de peso molecular (Mw). Los pesos moleculares (en kDa) del marcador se indican a la derecha del gel. El P[8]Wa corresponde al linaje I y el P[8]c al linaje III, cepa RVA/Human-wt/VLC/3455/2015/[G1P8]. El linaje IV corresponde a la cepa RVA/Human-tc/BGD/MMC71/2005/G1P[8].



**Figura 17.** Ensayos de unión tipo ELISA del rotavirus VP8\* de diferentes genotipos a un panel de azúcares biotinilados. Los pares de interacción se indican en cada panel desde el panel A al panel J.

Los genotipos P[4], P[6] y P[8] reconocieron el antígeno H tipo 1 (Fuc- $\alpha$ 1,2-Gal- $\beta$  1,3-GlcNAc, H1), P[11] reconoció el antígeno H tipo 2 (Fuc-  $\alpha$ 1,2-Gal-  $\beta$  1,4-GlcNAc, H2) y P[9], P[14] y P[25] el trisacárido del grupo sanguíneo A (GlcNAc- $\alpha$ 1,3-(Fuc- $\alpha$ 1,2)-Gal, Atri). El genotipo P[8] mostró una baja unión a este trisacárido. Sin embargo y contrariamente a los informes anteriores (Liu *et al.*, 2017), en nuestros ensayos los genotipos P[4] y P[8] mostraron muy poca o ninguna interacción con Lewis<sup>b</sup> (Fuc-  $\alpha$ 1,2- Gal-  $\beta$  1,3-[Fuc-  $\alpha$ 1,4-]GlcNAc). Sorprendentemente, la VP8\* del genotipo P[8] reconoció el precursor del antígeno H1, lacto-N-biosa (Gal-  $\beta$  1,3-GlcNAc, Lewis<sup>c</sup>, LNB; figura 17) pero se encontraron diferencias en las capacidades de unión entre diferentes linajes y cepas. En el caso de las VP8\* de la cepa cultivable de rotavirus humano Wa (P[8]Wa) y de la vacuna Rotarix (P[8]Rotarix) (ambas del linaje I), dieron señales más bajas con H1 y LNB que el VP8\* de la cepa del linaje IV (P[8]LIV) de un aislado clínico y el perteneciente al linaje III (P[8]c) (Figura 17). La interacción

con la LNB se caracterizó además mediante el ensayo a diferentes concentraciones de VP8\* de este aislado (P[8]c) y de la cepa cultivable P[8]Wa (Figura 18). Los resultados mostraron que ambas proteínas son capaces de unirse a H1 y LNB, aunque la unión al primer antígeno fue mayor.



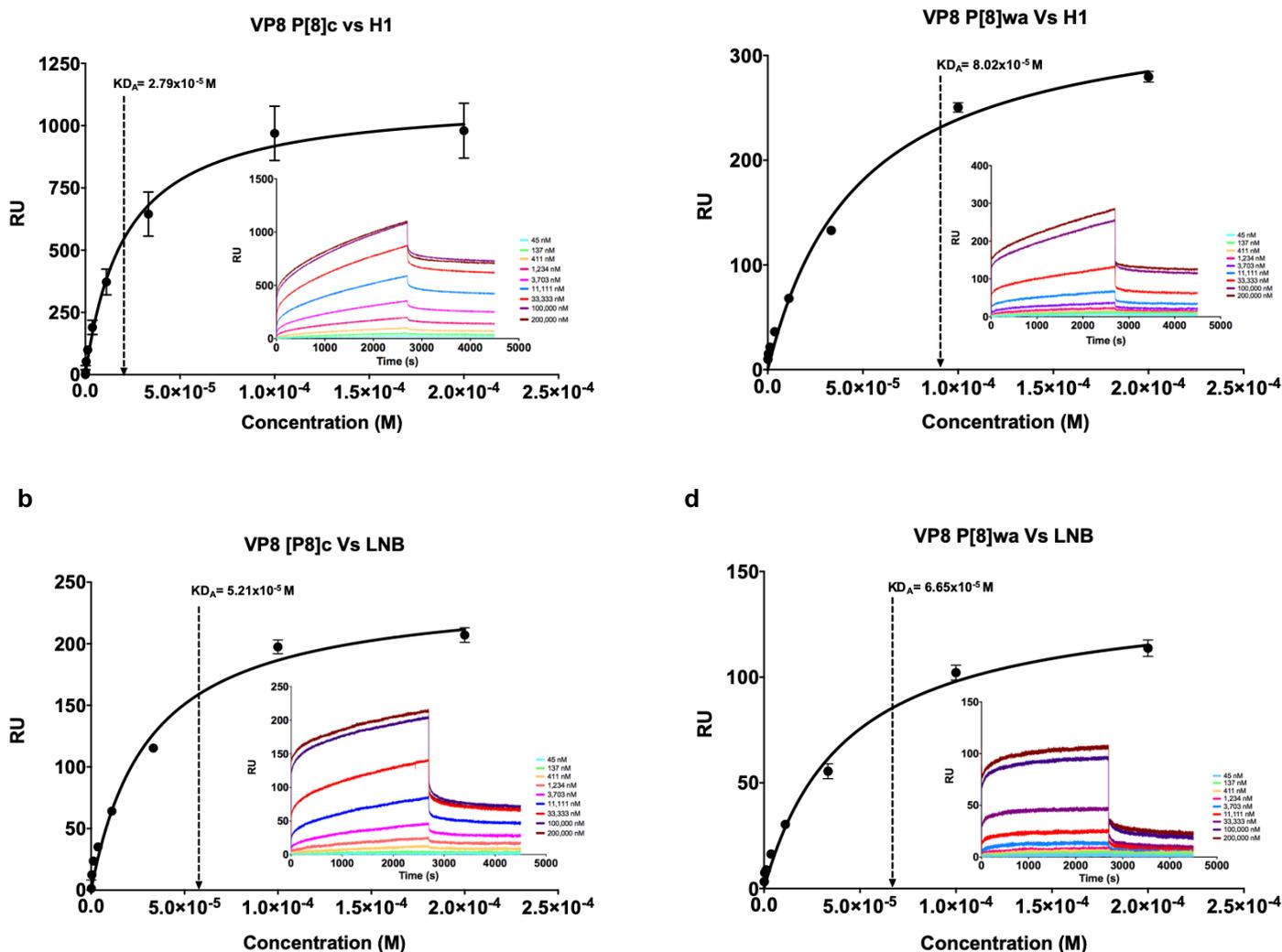
**Figura 18.** Caracterización de la interacción de P[8]c y P[8]Wa con el antígeno H1 y la lacto-N-biosa (LNB) por ELISA. El gráfico muestra que la unión es dependiente de la concentración de VP8\* del aislado clínico (P[8]c) y de la cepa cultivable Wa (P[8]Wa) al antígeno H1 y a su precursor LNB.

Se caracterizó de forma más detallada la interacción de VP8\* a H1 y LNB mediante la determinación por SPR de las constantes de afinidad aparente ( $KD_a$ ) para cada par de interacción (Tabla 11).

Ligando vs analito	$KD_a$ (M)
P[8]c vs H1	$2.79 \times 10^{-5} \pm 7.17 \times 10^{-7}$
P[8]c vs LNB	$5.21 \times 10^{-5} \pm 4.26 \times 10^{-7}$
P[8] <sub>Wa</sub> vs H1	$8.02 \times 10^{-5} \pm 2.21 \times 10^{-7}$
P[8] <sub>Wa</sub> vs LNB	$6.65 \times 10^{-5} \pm 6.47 \times 10^{-7}$
P[8]c M4(Ile173Val) vs H1	$3.90 \times 10^{-5} \pm 1.25 \times 10^{-7}$
P[8]c M4(Ile173Val) vs LNB	$4.94 \times 10^{-5} \pm 1.74 \times 10^{-7}$

**Tabla 11.** Constantes de afinidad entre diferentes proteínas VP8\* y HBGAs determinadas por SPR.

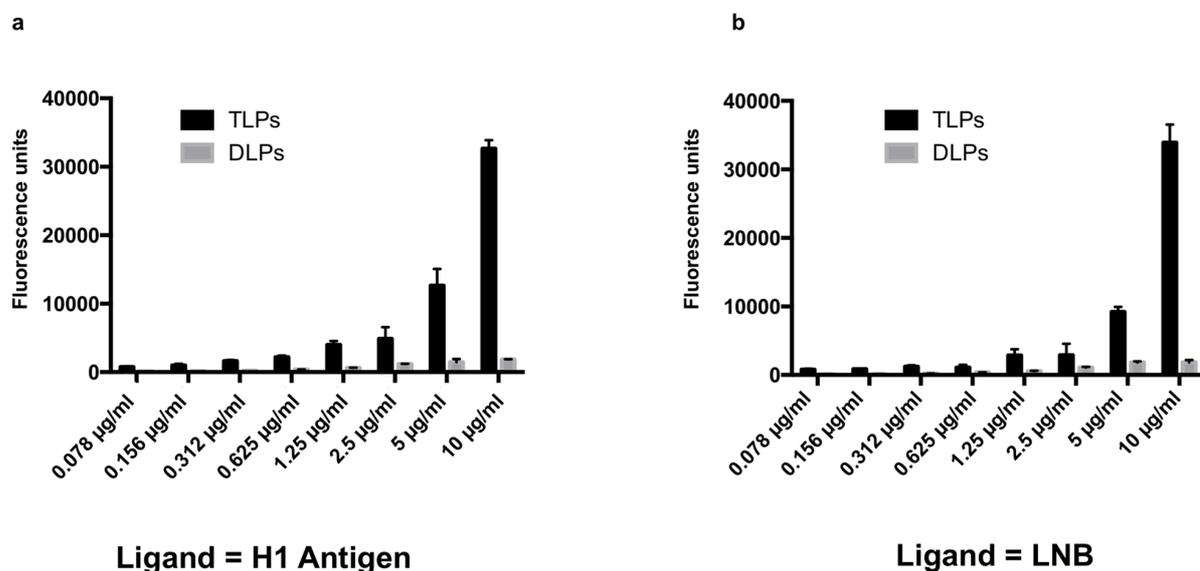
La  $KD_a$  de VP8\* P[8]c al antígeno H1 ( $KD_a = 27,9 \pm 0,71 \mu\text{M}$ ; Figura 19A) fue dos veces menor en comparación con la del precursor, la LNB ( $KD_a = 52,1 \pm 4,26 \mu\text{M}$ ; Figura 19B). Esta diferencia fue significativa ( $p = 0,0045$ ), lo que sugiere que la fracción de L-fucosa de H1 contribuye activamente a la unión. Sorprendentemente, la constante de afinidad para la interacción de P[8]<sub>Wa</sub> con H1 fue tres veces mayor ( $KD_a = 80,2 \pm 2,21 \mu\text{M}$ ) que la del P[8]c (Figura 19C). Además, P[8]<sub>Wa</sub> mostró una afinidad similar para la LNB que para H1 ( $KD_a = 66,5 \pm 6,47 \mu\text{M}$ ;  $p > 0,05$  figura 19D). Las interacciones para VP8\* de la cepa Rotarix (linaje I) y la cepa del linaje IV con H1 y LNB fueron demasiado bajas para ser determinadas bajo nuestras condiciones de SPR.



**Figura 19.** Caracterización de la unión del antígeno H1 y su precursor al VP8\* del genotipo P[8]. a. Ajuste de afinidad y sensogramas de la interacción entre P[8]c y el antígeno H1. b. entre P[8]c y LNB. c y d. entre P[8]Wa y el antígeno H1 y LNB, respectivamente. Las barras indican la desviación estándar.

Para caracterizar aún más el papel de la interacción de VP8\* con el precursor H1, la LNB, las TLPs (partículas de triple capa; TLP) de la cepa Wa y las partículas de doble capa (DLP; obtenidas después de la eliminación de VP4 y VP7 mediante el tratamiento con EDTA) se analizaron mediante un ensayo de unión tipo ELISA. Las TLPs fueron capaces de unirse al antígeno H1 (Figura 20A) y a su precursor LNB (Figura 20B) de forma dependiente de concentración, pero no las DLPs. Esto indica que la interacción observada entre el P[8] y la LNB

también era reproducible en el caso del virus completo. Estos resultados también apuntan al hecho de que a pesar de la baja afinidad de P[8] del linaje I al antígeno H1 y LNB, la alta avidéz de una partícula vírica (los viriones contienen 120 moléculas de VP4) resulta en una interacción medible.



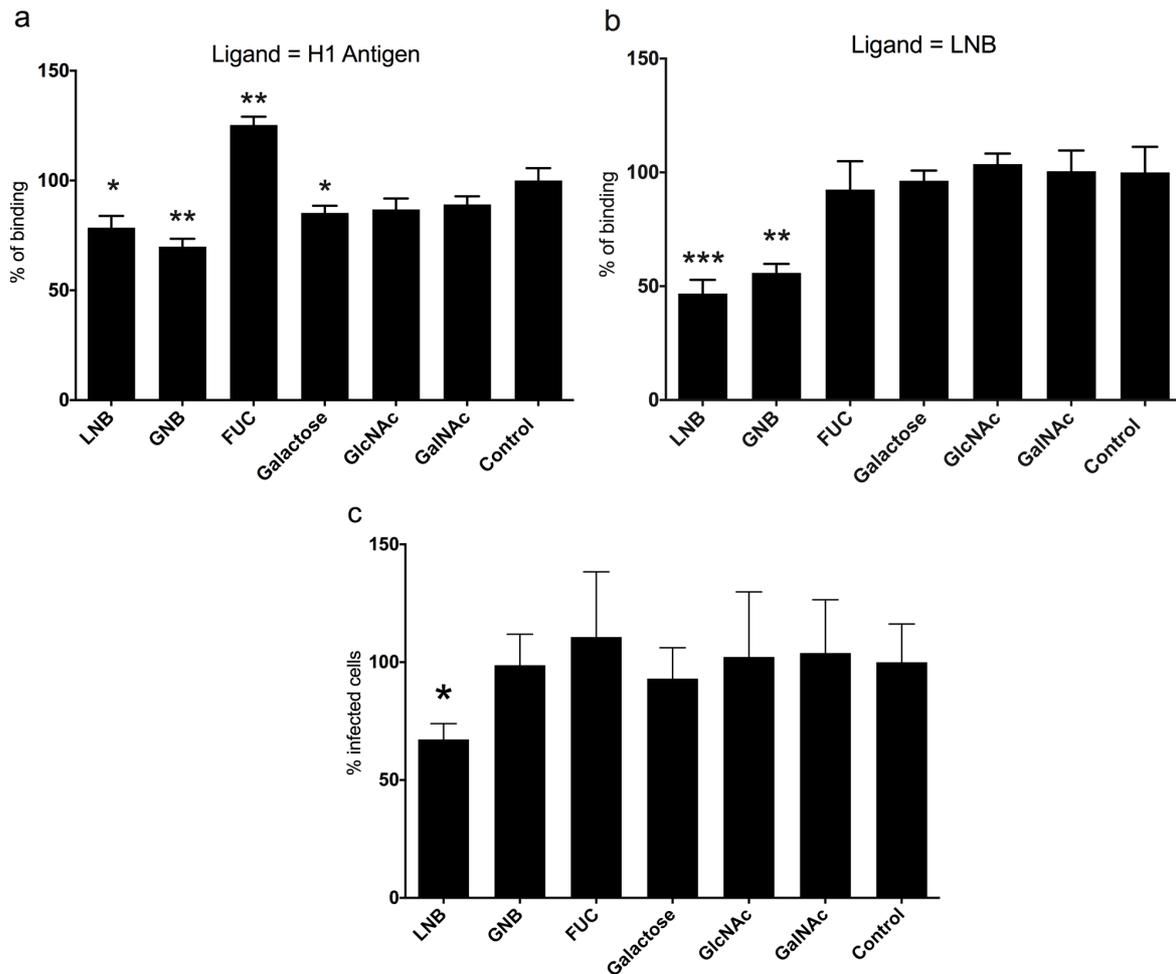
**Figura 20.** Unión de las partículas de rotavirus al antígeno H1 y a la lacto-n-biosa (LNB). Las partículas de triple capa (TLP) y las partículas de doble capa (DLP) del rotavirus se utilizaron en ensayos de unión contra el antígeno H1 (a) y contra su precursor (LNB) (b).

#### 4.3.2. La lacto-n-biosa soluble (LNB) y la galacto-N-biosa (GNB) bloquean parcialmente la unión de VP8\* al antígeno H-tipo 1 y a su precursor

Para confirmar la unión de VP8\* del genotipo P[8]c a la LNB, se estableció un ensayo de bloqueo de la unión en el que, la LNB (Gal-  $\beta$  1,3-GlcNAc) y su disacárido estructuralmente relacionado galacto-N-biosa (Gal-  $\beta$  1,3-GalNAc; GNB), se probaron como inhibidores potenciales de la unión. Los resultados mostraron una reducción moderada pero significativa ( $p < 0,05$ ) en la unión al antígeno H1 por ambos disacáridos (24,2% de reducción para el LNB y 30,1% para el GNB; Figura 21A). También se probaron los componentes monosacáridicos de la LNB y la GNB (D-galactosa, N-acetilglucosamina y N-

acetilgalactosamina) y la L-fucosa (Figura 21). Entre estos azúcares, sólo la D-galactosa poseía una capacidad de bloqueo discreta pero significativa de la unión al antígeno H1 (reducción del 14,7%;  $p = 0,032$ ). Curiosamente, la L-fucosa soluble aumentó significativamente la unión de VP8\* al antígeno H1 (Figura 21A). Como era de esperar, cuando se utilizó la LNB como ligando, la LNB soluble y la GNB redujeron la unión de VP8\* P[8]c, en un 52,2% y 44,1%, respectivamente (Figura 21B).

Posteriormente se investigó el papel del precursor del antígeno H1 en la infección por rotavirus mediante la co-incubación de rotavirus Wa con LNB, GNB, sus componentes monosacáridicos y L-fucosa durante la infección de células MA104. Sólo la LNB bloqueó significativamente la infección viral (reducción del 33%; Figura 21C), lo que sugiere que este precursor del HBGA interfiere con la unión de la cepa Wa a su receptor en las células MA104.

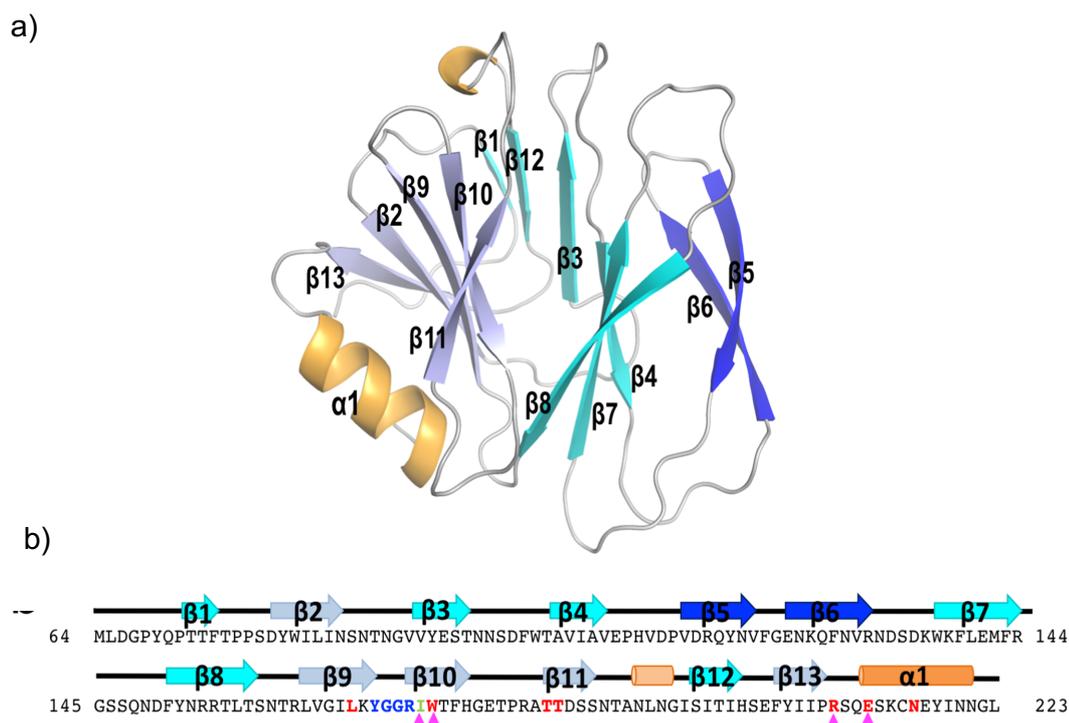


**Figura 21.** Experimentos de unión y bloqueo de infecciones. La lacto-n-biosa (LNB) y la galacto-n-biosa (GNB) solubles, así como los monosacáridos L-fucosa (FUC), D-galactosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc) y N-acetilgalactosamina (GalNAc) se utilizaron a 20 mM para bloquear la unión de VP8\* del genotipo P[8]c al antígeno H1 (a) y a la LNB (b). Se utilizaron los mismos azúcares a 5 mg/mL para bloquear la infección del rotavirus Wa en las células MA104. Las diferencias estadísticas se indican con asteriscos. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p = 0,001$  (c).

#### 4.3.3. Los glicanos unen VP8\* en un sitio de unión preformado

Para entender la base molecular del reconocimiento y unión de LNB y H1 con P[8] VP8\*, determinamos la estructura cristalina de la VP8\* P[8] del aislado clínico en su forma apo y unido a los glicanos LNB y H1. Se obtuvieron dos estructuras cristalográficas diferentes de P[8]c VP8\* en su forma apo. La primera estructura, VP8\*-Apo1, difractó a una resolución de 1,35 Å y presenta una sola copia de P[8]c VP8\* en la unidad asimétrica de cristal (ASU), mientras que la

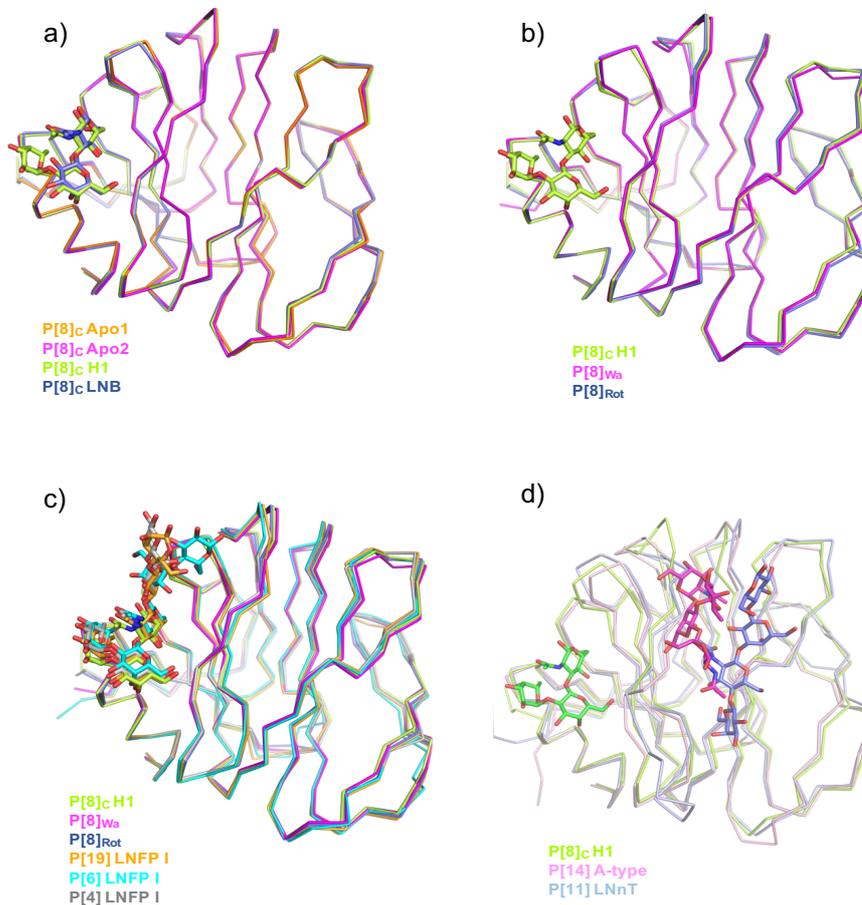
segunda estructura, VP8\*-Apo2, difracta a 1,5 Å y presenta dos copias en la ASU (Tabla 9). Las tres copias de P[8]c VP8\* en estas dos estructuras cristalinas presentan el pliegue de galectina con dos hojas  $\beta$  separadas por una hendidura superficial que conforma el sitio de unión del glicano en los genotipos P[11] y P[14] (Hu *et al.*, 2012, 2015) (Figura 22).



**Figura 22.** Estructura de la VP8\* P[8]c. **a.** Representación de VP8\* P[8]c Apo1 mostrando la estructura secundaria. En azul para las hojas  $\beta$ , naranja para  $\alpha$ -helices y blanco para loops. Se utilizan diferentes tonos de azul para diferenciar entre hojas  $\beta$ . Los elementos de estructura secundaria están numerados y etiquetados en orden desde el N-terminal hasta el C terminal. La secuencia de P[8]c VP8\* se muestra en **b**, destacando con letras rojas los residuos que interactúan con el azúcar H1 y con letras azules la horquilla  $\beta$  9-  $\beta$  10. Los triángulos magenta indican residuos mutados en este estudio. Los elementos estructurales se muestran sobre la secuencia coloreada como en la representación de la caricatura.

La superposición de los protómeros individuales VP8\* a partir de estos cristales mostró que las tres moléculas de P[8]c VP8\* son casi idénticas (RMSD 0,28 Å para la superposición de todos los C  $\alpha$ ; Figura 23 y Tabla 11). Los cristales de P[8]c unidos a H1 o a su precursor LNB se obtuvieron en una tercera estructura

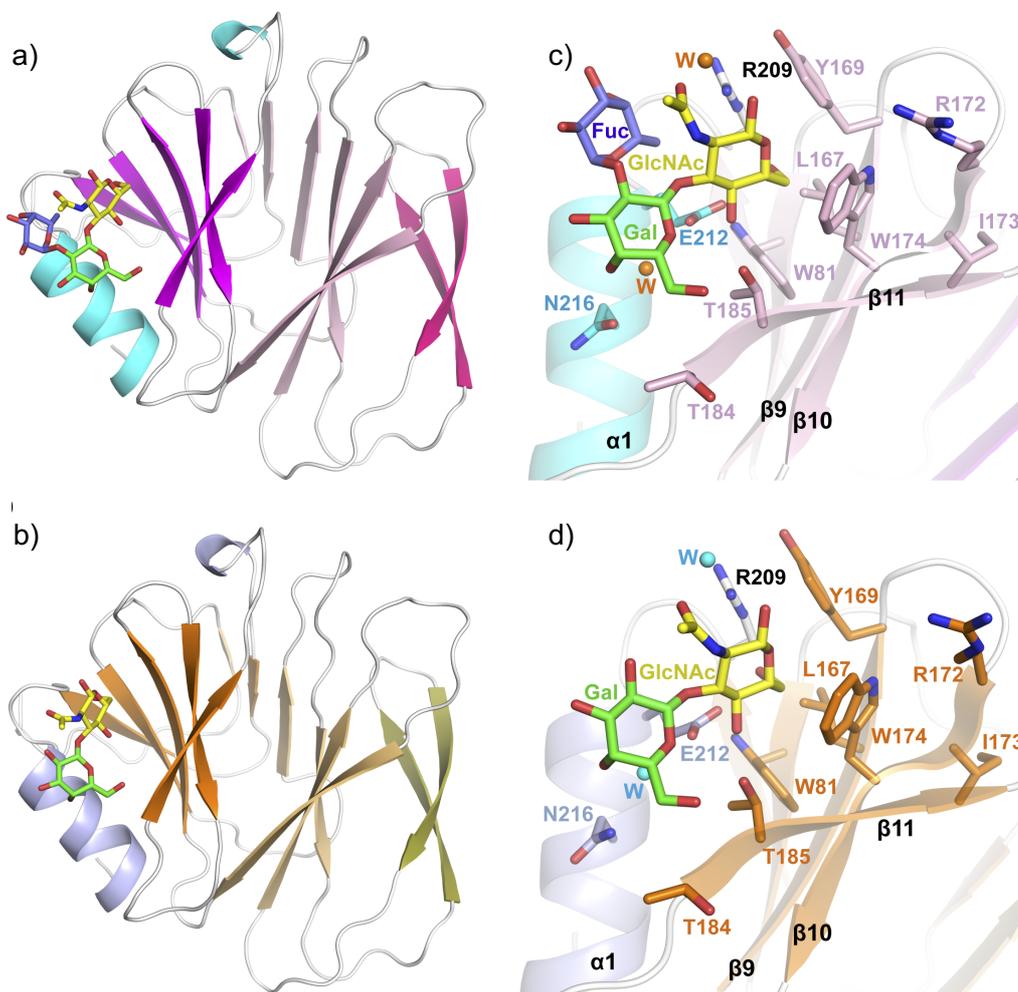
crystalográfica diferente y las estructuras de los complejos P[8]c VP8\*-H1 y P[8]c VP8\*-LNB se resolvieron a 1,8 y 1,3 Å, respectivamente (Figura 24A, 24B y Tabla 11).



**Figura 23.** VP8\* P[8]c tiene un sitio de unión al azúcar preformado que coincide con lo observado en virus del mismo genogrupo. **a.** Superposición de las estructuras troncales de P[8]c en su forma apo (Apo1 y Apo2 en naranja y magenta, respectivamente), y en el complejo H1 (verde) y LNB (azul). Los glicanos unidos a P[8]c se muestran en forma de varillas con átomos de carbono coloreados según la estructura correspondiente. **b.** Superposición de las estructuras de P[8]c - H1 (verde) con las formas VP8\* apo del linaje I P[8]Wa (magenta; PDB 2DWR (Blanchard *et al.*, 2007)) y P[8] Rotarix (azul; PDB 5JDB (Sun *et al.*, 2018)). El glicano H1 se muestra en varillas con átomos de carbono de color verde. **c.** Superposición de estructuras VP8\* de diferentes miembros del linaje II. Estructuras troncales de las proteínas VP8\* en su forma apo de P[8]Wa (magenta; PDB 2DWR (Blanchard *et al.*, 2007)) y P[8]Rotarix (azul; PDB 5JDB (Sun *et al.*, 2018)) o en complejo con diferentes glicanos de P[8]c (verde), P[19] (naranja; PDB 5VKS (Yang Liu *et al.*, 2017)), P[6] (cian; PDB 5VX9 (Hu *et al.*, 2018)) y P[4] (gris; PDB 5VX5 (Hu *et al.*, 2018)) se superponen y los glicanos ligados (H1 o LNFP I) se muestran como varillas con átomos de carbono coloreados según la estructura correspondiente. **d.** Superposición de estructuras de P[8]c VP8\* (verde), P[14] VP8\* (rosa; PDB 4DS0 (Hu *et al.*, 2012)) y P[11] VP8\* (azul claro; PDB 4YG0 (Hu *et al.*, 2015)) ligadas a glicanos H1, A-type y LNnT (en varillas), respectivamente, mostró que la localización de las cavidades de unión del azúcar difiere entre grupos.

Código PDB	RMSD (Å)	P[8]c Apo1	P[8]c Apo2	P[8]c LNB	P[8]c H1	P[8] <sub>Wb</sub>	P[8] <sub>rot</sub>	P[4]	P[19]	P[6] LNFP1	P[6]	P[4] LNFP1
6H9W	P[8]c Apo1	0	0,28	0,28	0,34	0,27	0,44	0,51	0,57	0,72	0,57	0,51
6H9Z	P[8]c Apo2		0	0,35	0,33	0,35	0,55	0,56	0,61	0,81	0,56	0,54
6H9Y	P[8]c LNB			0	0,22	0,41	0,57	0,6	0,59	0,84	0,54	0,62
6HA0	P[8]c H1				0	0,37	0,54	0,56	0,61	0,81	0,57	0,58
2DWR	P[8] <sub>Wb</sub>					0	0,5	0,46	0,53	0,84	0,57	0,47
5JDB	P[8] <sub>rot</sub>						0	0,65	0,66	0,73	0,65	0,74
2AEN	P[4]							0	0,61	0,69	0,63	0,43
5VKI	P[19]								0	0,66	0,56	0,59
5VX9	P[6] LNFP1									0	0,71	0,67
5VX8	P[6]										0	0,64
5VX5	P[4] LNFP1											0

**Tabla 12.** Valores RMSD para la superposición de todos los átomos de las estructuras VP8\* de diferentes rotavirus de linaje P[II] (Apo o ligados por glicano).



**Figura 24.** Estructuras de P[8]c en complejo con el antígeno H1 y LNB.

**a.** Representación de la estructura P[8]c. El antígeno H1 unido entre una hoja  $\beta$  y la hélice  $\alpha$  se muestra en “sticks” con átomos de carbono en amarillo, verde y azul para los motivos GlcNAc, Gal y Fuc. **b.** Representación de la estructura de P[8]c- LNB. La LNB unida se representa como en (a). **c y d.** Vista de los centros activos P[8]c H1 (**c**) y P[8]c LNB (**d**). Los azúcares ligados se representan en varillas con átomos en amarillo (GlcNAc), verde (Gal) y azul (Fuc).

Dos protómeros de VP8\* están presentes en la ASU de cada uno de estos cristales y, sorprendentemente, sólo uno de los dos protómeros mostró una molécula de glicano unida. La unión del azúcar induce cambios conformacionales insignificantes en la VP8\* (Figura 23) ya que la comparación estructural de los protómeros P[8]c VP8\* ligados al glicano y sin glicano mostraron diferencias mínimas (RMSD 0,22-0,35 Å; Tabla 12). Además, los P[8]c VP8\* también son estructuralmente idénticos (RMSDs 0.37-0.57 Å) a las formas VP8\* apo del linaje I de P[8]Wa y P[8]Rotarix (Figura 23 y Tabla 12), lo que demuestra que el sitio de unión del glicano se realiza en la proteína P[8]c VP8\*. Esta característica también parece ser compartida por otros genotipos P pertenecientes al genogrupo P[II], ya que la comparación estructural con estructuras recientemente estudiadas de VP8\* a partir de genotipos humanos P[4] y P[6], y P[19] porcinos mostró diferencias modestas (RMSD 0.51-0.84 Å) (Tabla 12 y Tabla 13).

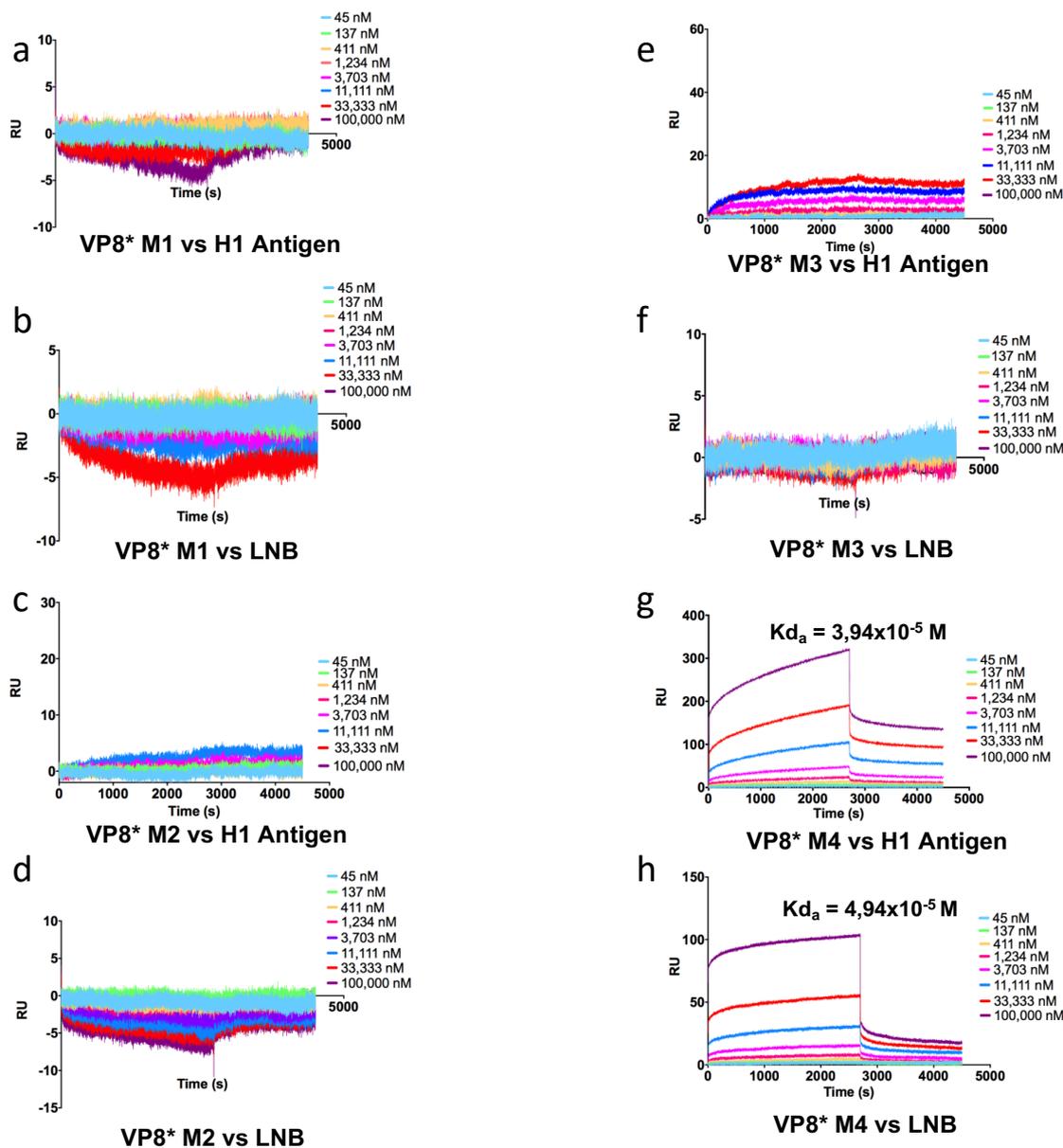
Tipo/Linaje	Cepas	Residuos del sitio de union H1/LNB													
		81	167	168	169	170	171	172	<u>173</u>	174	184	185	209	212	216
Tipo P[8]	RVA/Human-wt/BEL/BE0253/2008/G1P[8]	W	L	K	Y	G	G	R	<u>V</u>	W	T	T	R	E	N
	RVA/Vaccine/USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8]	.	F	.	Y	G	G	R	<u>V</u>	.	T	.	.	.	N
	RVA/Human-wt/BEL/BE1520/2009/G1P[8]	.	L	.	Y	G	G	R	<u>V</u>	.	T	.	.	.	N
	RVA/Human-wt/USA/Wa/1974/G1P[8]	.	L	.	Y	G	G	R	<u>V</u>	.	T	.	.	.	N
	RVA/Vaccine/USA/RotaTeq-WI79-4/1992/G6P1A[8]	.	L	.	Y	G	G	R	<u>I</u>	.	T	.	.	.	N
	RVA/Bethesda/DC140/1975/G3P[8]	.	L	.	Y	G	G	R	<u>I</u>	.	T	.	.	.	N
	RVA/Human-wt/BRA/RJ12419/2006/G12P[8]	.	L	.	Y	G	G	R	<u>I</u>	.	T	.	.	.	N
	RVA/Human-wt/BEL/BE00012/2006/G1P[8]	.	L	.	Y	G	G	R	<u>I</u>	.	T	.	.	.	N
	RVA/Human-wt/BRA/BA20142/2011/G12P[8]	.	L	.	Y	G	G	R	<u>I</u>	.	T	.	.	.	N
	RVA/Human-wt/VLC/3889/2018/G1P[8]	.	L	.	Y	G	G	R	<u>I</u>	.	T	.	.	.	N
	RVA/Human-wt/VLC/3455/2015/[G1P8]	.	L	.	Y	G	G	R	<u>I</u>	.	T	.	.	.	N
	RVA/Human-wt/BTN-49/BTN/2010/G9P[8]	.	L	.	Y	G	G	R	<u>I</u>	.	V	.	.	.	V
	RVA/Human-tc/BGD/MMC38/2005/G1P[8]	.	L	.	Y	G	G	R	<u>I</u>	.	V	.	.	.	V
	RVA/Human-tc/BGD/MMC71/2005/G1P[8]	.	L	.	Y	G	G	R	<u>I</u>	.	V	.	.	.	V
	RVA/Human-wt/BEL/BE1280/2009/G1P[8]	.	L	.	Y	G	G	R	<u>I</u>	.	V	.	.	.	V
	P[4]	RVA/Human-wt/BCN/2570/2012/G2[P4]	.	L	.	Y	G	G	R	<u>V</u>	.	T	.	.	.
P[6]	RVA/Human-wt/VLC/3173/2014/G12[P6]	.	L	.	H	Y	N	S	<u>V</u>	.	T	.	.	.	V

**Tabla 13.** Comparación de las posiciones de los aminoácidos implicados en la unión H1 y LNB en diferentes linajes P[8] de VP8\*. Los residuos críticos para la interacción H1 y LNB se determinaron en P[8]c VP8\* (linaje III). Los residuos que fueron mutados a alanina (174, 209 y 212). El residuo subrayado (posición 173) no hace contacto con los ligandos sino que difiere entre los linajes I y II, III y IV.

#### 4.3.4. Sitio de unión P[8] al glicano

P[8]c une H1 y LNB en un bolsillo formado por una de las hojas  $\beta$  y la  $\alpha$ -hélice C-terminal (Figura 24 A y 24 B). Las estructuras mostraron que la fracción de LNB está situada en el bolsillo interactuando con la proteína mientras que la L-fucosa se proyecta hacia el exterior, principalmente mediado por solventes, con mínimos contactos con la proteína (Figura 23A y 24B). Sólo siete residuos reconocen la LNB, entrando en contacto con la fracción de N-acetil-glucosamina a través de L167, W174, T185, R209 y E212 y la fracción de galactosa a través de T184, T185, E212 y N216 (Figura 24C y 24D y Tabla 14). Este sitio compartía residuos idénticos con el nuevo sitio de unión VP8\* descubierto recientemente en los genotipos P[19] y P[4]/P[6] por su interacción con la LNFPI y difiere del sitio de unión de carbohidratos previamente definido en VP8\* de los genotipos P[11] (unión de LacNAc (Liu *et al.*, 2013)) y P[14] (unión de antígeno A (Hu *et al.*, 2012)), que se encuentra en la hendidura entre las dos hojas  $\beta$  (Figura 23). La N-acetil-glucosamina tiene una importante contribución a la unión, ya que se inserta en el bolsillo, mientras que la galactosa adquiere una posición más superficial (Figura 24C y 24D). De esta manera, el anillo de N-acetil-glucosamina es un grupo entre W174 y R209 que define dos caras del sitio de unión y los enlaces de hidrógeno mediados por oxígeno O<sub>4</sub> y O<sub>6</sub> con E212 que se colocan en la parte inferior del sitio de unión (Figura 24C, 24D y Tabla 12). Para confirmar el papel de estos aminoácidos en la interacción con H1 y LNB, se obtuvieron los mutantes P[8]c VP8\* W174A (M1, VP8W174A), R209A (M2, VP8R209A) y E212A (M3, VP8E212A) (Figura 16). Los tres mutantes VP8\* perdieron la capacidad de interactuar con el receptor cuando fueron ensayados por SPR para

H1 y LNB (Figura 25), apoyando los datos estructurales y sugiriendo que el sitio de unión identificado es el único sitio de unión para el antígeno H1 y su precursor en P[8] VP8\*.



**Figura 25.** Caracterización de la interacción de las variantes M1, M2, M3 y M4 de los mutantes VP8\* con el antígeno H1 y la lacto-n-biosa (LNB) mediante SPR. De a a f. Pérdida de unión de los mutantes M1 a M3 al antígeno H1 (a, c y e) y a la LNB (b, d y f), confirmando la funcionalidad del sitio de unión VP8\*. g y h muestran unión y obtienen  $K_d$  del mutante M4 (Ile175Val P[8]c) a H1 y LNB, respectivamente.

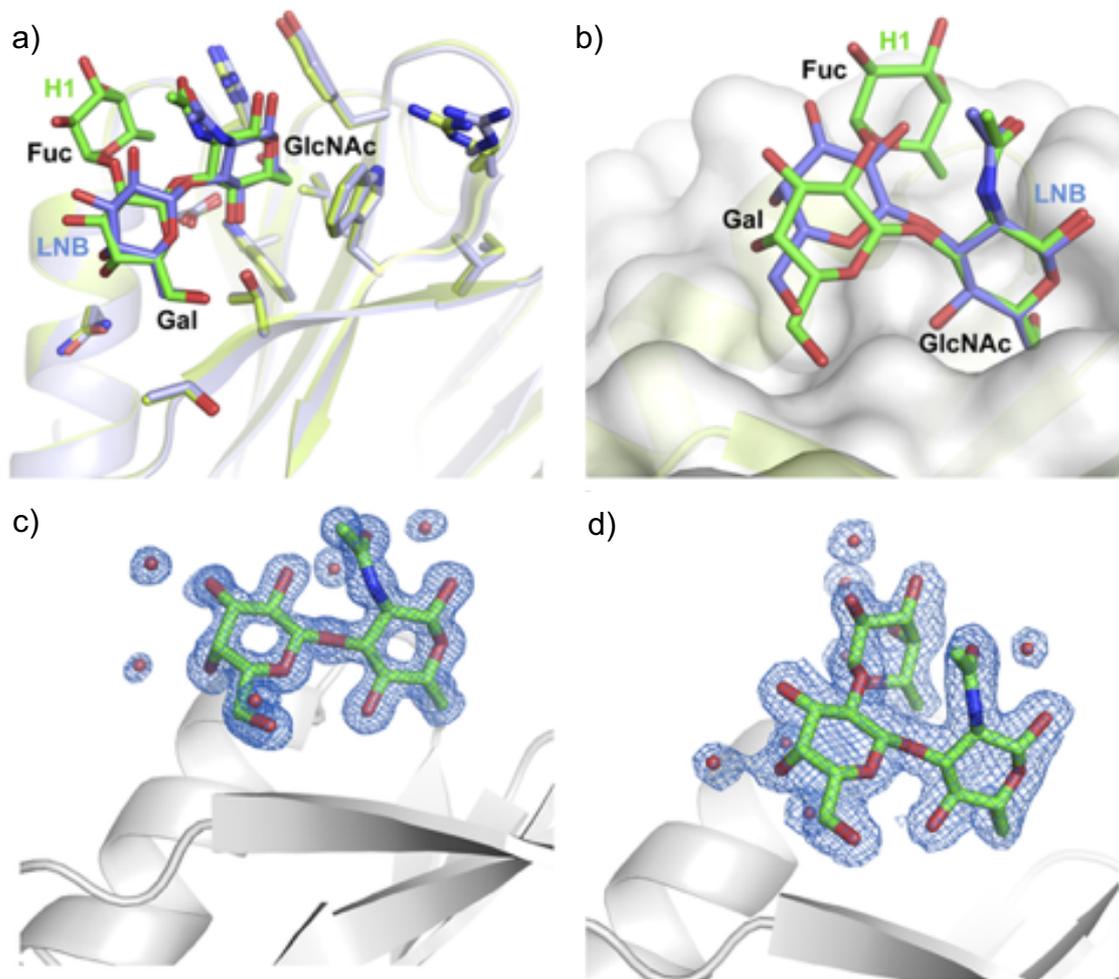
Lacto-N-Biose		VP8*			H1		VP8*						
Oligosacárid	Tipo de átomo	Residuo	Tipo de átomo	Distancia (Å)	Oligosacárid	Tipo de átomo	Residuo	Tipo átomo	Distancia				
GlcNAc	C1	209(ARG)	NH2	3.80	GlcNAc	C1	209(ARG)	NH2	3.90				
		174(TRP)	CH2	3.87			174(TRP)	CH2	3.71				
	O1	209(ARG)	NH2	3.51		O1	209(ARG)	NH2	3.47				
	O5	209(ARG)	NH2	3.21		O5	209(ARG)	NH2	3.21				
		174(TRP)	CZ2	3.93			174(TRP)	CZ2	3.80				
			169(TYR)	CD2		3.98			174(TRP)	CH2	3.82		
	C5	174(TRP)		CE2		3.81	C5	174(TRP)		CE2	3.86		
				CH2		3.83				CH2	3.55		
				CZ2		3.83				CZ2	3.74		
				CD2		3.68				CD2	3.81		
				CE3		3.64				CE3	3.59		
				CZ3		3.70				CZ3	3.50		
	C6	174(TRP)		CE2		3.82	C6	174(TRP)		CE2	3.23		
				CD2		3.54				CD2	3.03		
				CE3		3.93				CE3	3.27		
				CG		3.72				CG	3.03		
		167(LEU)	CD2	3.55						174(TRP)	NE1	3.72	
		212(GLU)	OE1	3.45						174(TRP)	CE2	3.23	
	O6	209(ARG)		NH2		3.72					174(TRP)	CH2	3.87
				CG		3.35					174(TRP)	CZ2	3.67
				CD		3.65					174(TRP)	CD1	3.88
				NE		2.83					174(TRP)	CZ3	3.72
				CZ		3.71					212(GLU)	OE1	3.92
		167(LEU)	CD2	3.36						209(ARG)	NH2	3.98	
		212(GLU)	CD	3.74				167(LEU)	CD2	3.37			
	C4	185(THR)		OG1		3.82			212(GLU)	OE1	3.05		
				OE2		3.11			185(THR)	OG1	3.85		
				CD		3.71			212(GLU)	OE2	3.20		
O4	185(THR)		OE1	3.55			212(GLU)	CD	3.80				
			CB	3.32			212(GLU)	OE1	3.65				
			OG2	2.66			185(THR)	CB	3.40				
			OG1	3.37			185(THR)	OG1	2.68				
	212(GLU)	OE2	2.53			185(THR)	OG2	3.43					
		CD	3.34			212(GLU)	OE2	2.61					
		OE1	3.41			212(GLU)	CD	3.35					
C3	212(GLU)	OE2	3.95			212(GLU)	OE1	3.38					
O3	212(GLU)	OE2	3.43			212(GLU)	OE2	3.89					
Gal	O5	185(THR)	OG1	3.48	Gal	O5	185(THR)	OG1	3.45				
		212(GLU)	OE2	3.88			212(GLU)	OE2	3.86				
	C6	184(THR)	CB	3.78		C5	185(THR)	OG1	3.95				
			N	3.60				184(THR)	CB	3.67			
	O6	184(THR)		CB		3.52	O6	184(THR)		CA	3.94		
				CA		3.88				185(THR)	OG1	3.42	
				C		3.74					N	3.50	
		185(THR)		CB		3.57				184(THR)	CB	3.53	
				OG1		2.66				184(THR)	CA	3.96	
				C		3.92				185(THR)	C	3.84	
			O	3.49				185(THR)	CB	3.69			
			N	2.81				185(THR)	OG1	2.71			
			CA	3.56				185(THR)	C	3.80			
								185(THR)	O	3.21			
						185(THR)	N	2.87					
						185(THR)	CA	3.61					
						O4	216(ASN)	OD1	3.98				
					Fuc	C6	209(ARG)	NH2	3.87				
							212(GLU)	OE2	3.86				

**Tabla 14.** Contactos entre el precursor LNB y los ligandos del trisacárido H1 con la proteína VP8\* de P[8]c.

#### 4.3.5. Papel de la fucosilación de Lacto-N-biosa en la interacción con la VP8\* P[8]

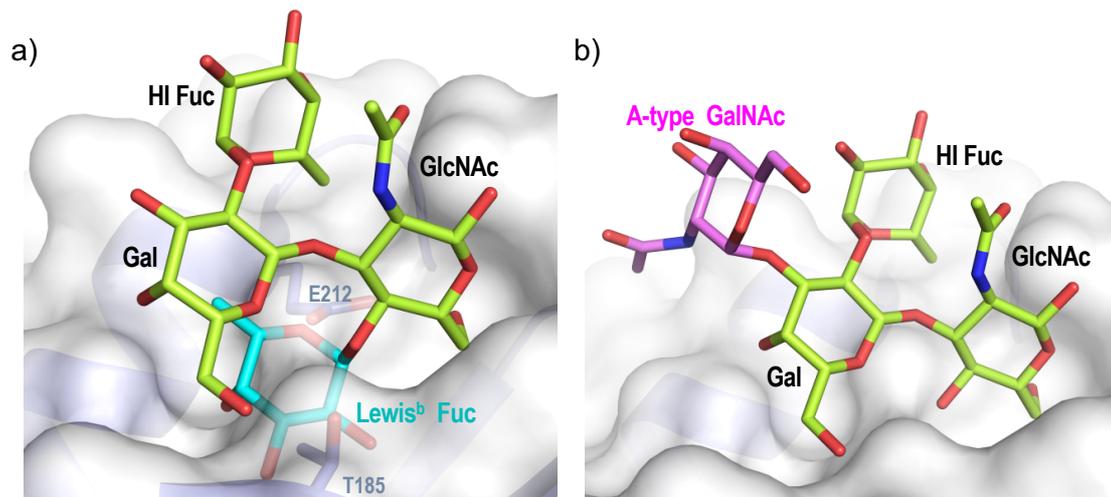
La fucosilación del precursor H1 está determinada genéticamente por el gen *FUT2* (fucosilación  $\alpha$ -1,2 de la galactosa terminal), que define el estado secretor, y por el gen *FUT3* (fucosilación  $\alpha$ -1,3 en el precursor N-acetil-glucosamina), que define el estado de Lewis (Figura 15). Este perfil de glicanos determinados genéticamente es un factor de susceptibilidad en rotavirus humanos (Larsson *et al.*, 2006; Lindesmith 2003). La estructura P[8]c en complejo con el antígeno H1 confirma que el residuo L-fucosa de individuos secretores tiene contactos reducidos con la VP8\*. Asimismo, se observaron contactos mínimos o nulos de la fracción L-fucosa en los complejos de la LNFPI con otras VP8\* del genogrupo P[II] (Hu *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2017). Por lo tanto, la diferencia en la afinidad por H1 y LNB en diversas VP8\* de este genotipo resulta difícil de explicar. Una visión de la disposición relativa del precursor H1 y la LNB en complejo con P[8]c después de la superposición de las proteínas VP8\*, mostró algunas diferencias, pero no así para los residuos que interactúan (Figura 26A). Si alternativamente, se superponen las fracciones de N-acetil-glucosamina de ambas estructuras, se hace visible que la fracción de galactosa ocupa una posición más expuesta a los disolventes en la estructura de la LNB que la del antígeno H1 (Figura 26B), lo que explica su unión más débil en comparación con este antígeno. La resolución atómica de los datos de difracción y la alta calidad de los mapas de densidad derivados de estos datos (Figura 26C y 26D) permiten modelar con precisión las estructuras de los ligandos para observar estas diferencias. Esta observación indica que la fracción L-fucosa induce a una conformación en la LNB más adecuada para la unión a VP8\*. La estructura P[8]c VP8\* en complejo con H1

muestra que el anillo de L-fucosa se apila sobre el grupo acetamido de N-acetilglucosamina estabilizando así la conformación del glicano (Figura 24C y 26B). Por lo tanto, estas estructuras sugieren que la fracción L-fucosa podría favorecer la unión del VP8\* mediante un doble mecanismo: inducir una conformación competente que facilite el reconocimiento del módulo de la LNB y mediar interacciones indirectas que estabilicen el complejo glicano-VP8\*.



**Figura 26.** Comparación la unión de P[8]c con H1 y LNB **a.** Sitio de unión del glicano de las estructuras superpuestas P[8]c VP8\* H1 (verde claro) y P[8]c VP8\* LNB (azul claro) muestra que los residuos que interactúan con el azúcar (en varillas) se alinean con diferencias mínimas. **b.** Superposición de las fracciones de GlcNAc del H1 (en varillas coloreado con carbonos en verde) y LNB (en varillas coloreado con carbonos en azul) de las estructuras con P[8]c VP8\*. Muestra que la fracción de galactosa en la estructura LNB ocupa una posición más superficial. **c** y **d** Los mapas de alta calidad de densidad de electrones obtenidos por difracción de rayos X para P[8]c VP8\* en complejo con LNB (**c**) y H1 (**d**), proporcionan un alto nivel de detalles.

Por el contrario, la fucosilación en la N-acetil-glucosamina del precursor, LNB para producir el antígeno Lewis<sup>b</sup> parece ser incompatible con la unión a P[8] VP8\*. El acoplamiento del antígeno Lewis<sup>b</sup> (Fuc- $\alpha$ -1,2-Gal- $\beta$ 1,3-[Fuc- $\alpha$ -1,4]GlcNAc) en la estructura P[8]c VP8\* tomando como referencia el antígeno H1 mostró que la L-fucosa  $\alpha$ -1,4 unida se orienta hacia el interior del sitio de unión del glicano, chocando con diferentes residuos (principalmente T185 y E212) que generan esta cavidad (Figura 27). Dado que el sitio de unión del glicano está muy conservado entre los linajes P[8] VP8\* y los genotipos P[II] (Hu *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2017), parece que este genogrupo de rotavirus no es competente para unir a los antígenos Lewis. Esta observación es confirmada por nuestros ensayos de ELISA en los que, ninguna de las proteínas VP8\* del genotipo P[II] muestra capacidad de unión a estos HBGAs, y cuestiona resultados anteriores en los que se demostró que P[8] VP8\* interactuaba con Lewis<sup>b</sup> (Huang *et al.*, 2012). Siguiendo una estrategia idéntica, el antígeno A de tipo I puede acoplarse en el sitio de unión al azúcar de P[8]c. El azúcar unido mostró que la N-acetilgalactosamina (GalNAc) añadida en el extremo no reductor de la galactosa H1 apunta hacia el disolvente sin mostrar interacción con la proteína (Figura 27B), lo que apoya que P[8] VP8\* debería ser capaz de ligar este azúcar.

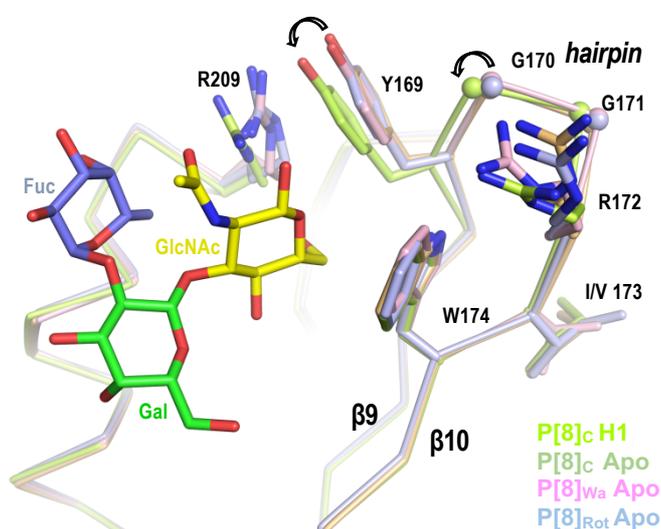


**Figura 27.** Evidencias estructurales de la selectividad del azúcar P[8]c VP8\*. El modelado de los antígenos Lewis<sup>b</sup> (a) y A-tipo (b) en estructuras P[8]c VP8\* H1 muestra que la Fuc del Lewis<sup>b</sup> (en varillas con átomos de carbono coloreados en cian) se proyecta desde el glicano H1 (en varillas con átomos de carbono en verde) hacia la proteína VP8\* (en azul resaltando la superficie de la proteína en representación semitransparente de color blanco) chocando con diferentes azúcares reconociendo residuos como T185 y E212. En el caso del antígeno A tipo I, la presencia de una fracción adicional de GalNAc (en palitos con átomos de carbono coloreados en magenta) no tiene problemas estéricos ya que se proyecta hacia el solvente.

#### 4.3.6. Diferencias estructurales sutiles afectan a la afinidad y especificidad de la unión del glicano

Las estructuras de VP8\* en complejo con LNB y H1 obtenidas aquí confirman que P[4], P[6], P[19] y el genotipo humano predominante P[8] de rotavirus comparten un sitio común de unión al glicano que se conserva altamente en estructura y secuencia. Por lo tanto, las diferencias en afinidad y especificidad por los HBGAs observadas en nuestros ensayos ELISA y SPR, así como las publicadas por otros autores, son sorprendentes. En particular, las diferencias en la capacidad de interactuar con el antígeno H1 observadas entre los linajes P[8] son difíciles de entender. La inspección de los aminoácidos que definen el sitio de unión del glicano en los cuatro linajes P[8] mediante la comparación de estructuras P[8]c, P[8]Wa y P[8]Rotarix reveló diferencias interesantes. En primer lugar, la proteína VP8\* de la cepa Rotarix (linaje I) difiere de otros

miembros del mismo linaje, incluida la cepa Wa, por la sustitución de la leucina 167 por fenilalanina. Dado que L167 se coloca en la parte inferior del sitio de unión del azúcar (Figura 24C y 24D), la introducción de un residuo voluminoso de Phe podría explicar la falta de interacción de esta cepa vacunal con el antígeno H1 (Sun *et al.*, 2019) que fue corroborada en nuestro estudio. En segundo lugar, una inspección minuciosa de las estructuras P[8] reveló pequeñas diferencias en la disposición en el bucle que conecta las hebras  $\beta$  9 y  $\beta$  10 (Figura 28).



**Figura 28.** Movimientos mínimos inducidos por la unión del azúcar a P[8] VP8\*. Las estructuras de P[8]Wa (rosa; PDN 2DWR), P[8]Rotarix (azul claro; PDB 5JDB) y P[8]c (naranja) en sus formas apo se superponen con P[8]C en complejo con H1 (verde) y se muestra los elementos estructurales que conforman el sitio de unión del glicano. El antígeno H1 unido se representa en varillas con átomos de carbono en amarillo (GlcNAc), verde (Gal) y azul (Fuc). Los residuos que interactúan con los azúcares se muestran en varillas, con átomos de carbono coloreados según el elemento estructural al que corresponden. Los átomos de oxígeno y nitrógeno están coloreados en rojo y azul oscuro, respectivamente, en toda la estructura. Se observa un sutil desplazamiento del bucle que conecta  $\beta$ 9-  $\beta$ 10 entre las formas libres de glicanos y las ligadas a glicanos. Un desplazamiento similar se observa en el residuo Y169. El desplazamiento del bucle se ve facilitado por la presencia de dos residuos de Gly (G170 y G171) representados como esferas. El residuo hidrofóbico (Val o Ile) en la parte posterior del sitio de unión del glicano en la posición 173 se muestra como varillas.

Estas dos hojas  $\beta$  definen el fondo del sitio de unión del glicano donde se asienta la fracción LNB (Figura 24C y 24D). Estos movimientos sutiles están mediados

por la presencia de dos residuos de Gly (G170 y G171) que confieren flexibilidad al bucle. Y169 y R172 a ambos lados de las Glys delimitan el bucle y juegan un papel fundamental en la correcta organización del sitio de unión, ya que Y169 se apila sobre R209 y R172 interactúa con W174, los principales residuos que reconocen N-acetil-glucosamina (Figura 24C, 24D y Figura 27). Por lo tanto, la disposición de este bolsillo podría modular la afinidad y especificidad del glicano. El análisis de la secuencia de esta región entre los linajes P[8] revela que en la posición 173 el linaje I presenta un Val mientras que en el resto de los linajes se encuentra una Ile (Tabla 13). La posición 173 se coloca en la base de las hojas  $\beta$  orientado hacia el núcleo hidrófobo de la proteína VP8\* (Figura 24C, 24D y figura 27). Por lo tanto, nos preguntábamos si este cambio sutil podría influir en la arquitectura del sitio de unión al glicano, teniendo en cuenta la diferencia en las afinidades de H1 observadas entre linajes. Para probar esta posibilidad diseñamos un nuevo mutante en el que I173 en P[8]c fue reemplazada por Val (M4, VP8I173V), imitando P[8]Wa. Este cambio resultó en una proteína VP8\* con una interacción disminuida al antígeno H1, con una constante de afinidad ( $KD_a = 39.0 \pm 1.25 \mu\text{M}$ , Figura 25, Tabla 11) 1.4 veces más alta en comparación con la proteína silvestre ( $KD_a = 27.9 \pm 0.71 \mu\text{M}$ , Tabla 11;  $p = 0.0002$ ). La variante de VP8 I173V mantuvo la capacidad de unión a la LNB con una constante de afinidad aparente ( $KD_a = 49,4 \pm 1,74 \mu\text{M}$ , Tabla 11) que continuó siendo superior a la del H1 ( $p = 0,0033$ ). Estos resultados apoyan que cambios sutiles de aminoácidos en el bucle cercano al sitio de unión pueden estar contribuyendo a modular la afinidad por el glicano entre P[8] VP8\* de los linajes I y III. Las diferencias en este sitio también son evidentes en las estructuras de VP8\* del genogrupo P[II]. Mientras que la conservación entre P[8] y P[4] es alta, la

divergencia de secuencias entre P[4] y P[6] (Tabla 13) podría explicar las diferentes afinidades para la LNFPI entre estos dos genotipos (Hu *et al.*, 2018).

#### 4.4. Discusión

La interacción entre los virus y los HBGAs ha surgido como un factor importante en la infectividad viral. A diferencia de otros virus entéricos (por ejemplo, norovirus), en un principio se descuidó la importancia de la interacción HBGA en los rotavirus, y los estudios de adhesión de las células huéspedes a los virus se centraron principalmente en la unión al ácido siálico, hasta que los análisis estructurales de VP8\* sugirieron interacciones con los HBGAs (Blanchard *et al.*, 2007) y se determinó experimentalmente en las cepas insensibles a la sialidasa (Huang *et al.*, 2012). En norovirus muchos estudios señalan el polimorfismo *FUT2* humano como una característica clave que afecta a la infectividad viral (Larsson *et al.*, 2006; Lindesmith 2003). Los individuos portadores de dos alelos afuncionales de *FUT2* carecen de actividad de la fucosil-2-transferasa, no expresan estructuras de antígeno H en la mucosa intestinal y en las secreciones (no secretores) y son menos susceptibles a las infecciones por norovirus. Mientras que estudios anteriores no mostraron ninguna correlación entre el estado secretor y la infección por rotavirus (Larsson *et al.*, 2006), los estudios más recientes demuestran que los títulos de anticuerpos frente a rotavirus (Nordgren *et al.*, 2014), la incidencia de la gastroenteritis por rotavirus (Payne *et al.*, 2015) y la efectividad de la vacuna (Kazi *et al.*, 2017) se correlacionan con el fenotipo de *FUT2*.

Sin embargo, los mecanismos moleculares de estas correlaciones eran desconocidos hasta ahora. La interacción previamente publicada del antígeno H1 (Fuc- $\alpha$ 1,2-Gal- $\beta$ 1,3-GlcNAc) con el genotipo P[8] del rotavirus humano más común, que ha sido caracterizado más a fondo aquí a nivel estructural, resalta la importancia del fenotipo de los secretores en la incidencia de la diarrea por

rotavirus. Hemos determinado las características de esta interacción, reconociendo un nuevo sitio de unión para H1 en VP8\* común para todos los miembros del genogrupo P[II]. Nuestros resultados muestran que la interacción física entre el antígeno H1 y el rotavirus P[8] se produce a través del precursor del H1 (LNB), reforzando la idea de que los principales contactos carbohidrato-proteína se realizan a través de la fracción de N-acetil-glucosamina (Liu *et al.*, 2017). Los estudios de RMN sobre la unión del antígeno A de P[9] y P[14] VP8\*, demostraron que la fracción de L-fucosa no entra en contacto con VP8\*, sino que permanece expuesta al disolvente con un alto grado de flexibilidad (Böhm *et al.*, 2015). Sin embargo, en el mismo estudio VP8\* de los genotipos P[4] y P[6], que no reconocieron el antígeno A en nuestros ensayos, se demostró que se unen a este antígeno y se evidenciaron los contactos de la proteína con L-fucosa (Böhm *et al.*, 2015). Los datos estructurales de P[4] y P[6] VP8\* en complejo con la LNFPI también mostraron una interacción limitada pero directa de la L-fucosa  $\alpha$ -1,2-ligada con la proteína, a través del residuo R209, que se conserva en todas las proteínas del genogrupo P[II] (Hu *et al.*, 2018). Debido a la interacción mínima de la L-fucosa a VP8\*, los autores de este estudio plantean la hipótesis de que esta fracción de glicano tiene una baja contribución a la afinidad de unión y que se esperaría una fuerte interacción para el precursor H1 no fucosilado, lo que explica los estudios epidemiológicos que no correlacionan el estado de FUT2 con la infección por los genotipos P[4] y P[6] (Kambhampati *et al.*, 2016). Por el contrario, mostramos que aunque la fracción de L-fucosa de H1 hace contactos indirectos con P[8] VP8\*, estabiliza la conformación competente de la fracción de LNB para interactuar con los residuos del azúcar, lo que da como resultado un  $KD_a$  dos veces más baja para H1 en comparación con la LNB. Esta diferencia

pequeña pero significativa puede ser relevante en el contexto de la susceptibilidad entre los individuos secretores y no secretores (FUT2-/-). Además, una interacción más débil con la LNB también puede explicar por qué la infección de rotavirus P[8] puede ocurrir, a un nivel más bajo, en individuos no secretores (Günaydin *et al.*, 2016) y también explica el efecto inhibitorio de la infección de rotavirus *in vitro* de la LNB que se demuestra aquí.

La interacción previamente presentada del genotipo P[8] con Lewis<sup>b</sup> identificada por los ensayos de ELISA (Huang *et al.*, 2012), no pudo ser reproducida en nuestros experimentos. Las pruebas estructurales obtenidas aquí y en los análisis estructurales de P[4] y P[6] en complejo con la LNFPI (Hu *et al.*, 2018) argumentan en contra de la interacción con Lewis<sup>b</sup>, que difiere de H1 por la presencia de una L-fucosa extra  $\alpha$ -1,4-ligada a la N-acetil-glucosamina que genera impedimentos estéricos en la interacción. Estas discrepancias, junto con las diferencias encontradas entre ELISA y SPR para la unión H1 en los diferentes linajes de P[8], sugieren que las pruebas cualitativas de ELISA no siempre proporcionan resultados fiables y que es necesario aplicar otras técnicas para evaluar las afinidades VP8\* con los HBGAs. Sin embargo, los datos estructurales de los genotipos P[4] y P[6] predicen la interacción con los HBGAs de los tipos A y B, ya que la N-acetilgalactosamina (tipo A) y la galactosa (tipo B) situadas en los extremos no reductores de estos glicanos no crean ningún obstáculo estérico (Hu *et al.*, 2018). Esto coincide con nuestra observación de que P[8] VP8\* de diferentes linajes interactúan con el carbono de trisacina del grupo sanguíneo A y también se apoya en la modelización de N-acetilgalactosamina adicional en H1 unida a P[8]c VP8\* (Figura 27).

Demostramos que existen variaciones en el dominio de unión en los linajes P[8] que justifican las diferencias en la afinidad por H1 y LNB según la medición de SPR. Además, aunque la arquitectura del sitio de unión es similar para la mayoría de los linajes P[8] y otros genotipos pertenecientes al grupo P[II], otros residuos proteicos fuera de este sitio pueden poseer efectos epistáticos sobre la capacidad del sitio de unión para acomodar a H1 y LNB, lo que explica las diversas afinidades entre los genotipos P[II] y en los diferentes linajes P[8].

Esto se ejemplifica con el hecho de que pudimos asociar un residuo que no participa en los contactos directos proteína-ligando (Valina 173) en P[8]wa VP8\* a su menor afinidad por la H1 y el LNB y que VP8\* de la cepa vacunal Rotateq (linaje II), aunque compartiendo residuos clave idénticos de unión al linaje III, no se unen a la H1 (Sun *et al.*, 2016). Se postula que cambios sutiles en los residuos dentro y fuera del sitio de unión definido, conducen a un ajuste fino en las afinidades HBGA que pueden en última instancia condicionar la capacidad de infección del huésped. Los estudios epidemiológicos revelaron la aparición de los linajes P[8] I, II y III como los principales rotavirus circulantes con una prevalencia del linaje III (Arista *et al.*, 2006; da Silva *et al.*, 2013; Zeller *et al.*, 2015), mientras que el linaje IV se encuentra raramente (da Silva *et al.*, 2013). Cabe mencionar que este linaje, que es filogenéticamente distante (Arista *et al.*, 2006), presenta algunas diferencias en el sitio de unión a H1 y mostró baja afinidad con el H1, ha sido aislado de pocos países pero parece estar expandiéndose rápidamente (Zeller *et al.*, 2015). Muchos estudios se han centrado en los genotipos de rotavirus que circulan antes y después de la introducción de los programas de vacunación contra rotavirus (Jere *et al.*, 2018; Zeller *et al.*, 2015), pero ningún trabajo ha abordado la cuestión de si existe un

vínculo entre el estado secretor y la incidencia de los diferentes linajes P[8]. En un estudio sobre el efecto del estado FUT2 en la gastroenteritis por rotavirus se demostró que el 100% de los pacientes (n = 51) fueron secretores positivos en comparación con un control sano o un grupo de pacientes con gastroenteritis no producida por rotavirus (14-19% de los no secretores) y que todos los rotavirus implicados eran P[8] del linaje III (Imbert-Marcille *et al.*, 2014). Los estudios sobre la dinámica de rotavirus G1P[8] en una población occidental mostraron que las antiguas cepas eran similares a la Wa (linaje I) y que desde finales de los años noventa han surgido nuevos linajes (Arista *et al.*, 2006), aunque los tres linajes principales circulan actualmente en la mayoría de las localidades geográficas. Algunos autores han argumentado que la falta (o baja) interacción de las cepas Wa con H1 puede ayudar a que estos virus prevalezcan, ya que no discriminan por el estado secretor (Böhm *et al.*, 2015), pero nuestros resultados sugieren que las afinidades por el receptor pueden variar dentro de los diferentes linajes P[8] y no se sabe cómo esto puede afectar a la eficacia biológica del virus. Cabe destacar que los aminoácidos que componen el sitio de unión H1/LNB se encuentran fuera de los epítomos definidos en VP8\* que provocan protección. Frecuentemente, se aíslan mutaciones en VP8\* que dan lugar a variantes antigénicas que podrían escapar a los anticuerpos neutralizantes (Zeller *et al.*, 2015), pero no están afectando a los residuos de interacción H1/LNB definidos aquí. El impacto de los diferentes linajes de rotavirus P[8] en la población en función del estado secretor merece estudios adicionales para determinar si la prevalencia o la cocirculación de los diferentes linajes P[8] responde a una adaptación a los perfiles HBGA de los diferentes huéspedes.

A pesar de la necesidad de una investigación más exhaustiva sobre la relevancia de los HBGAs y la especificidad del huésped en los rotavirus del genotipo P[8], los glicanos de superficie poseen una clara aplicación en el desarrollo de estrategias antivirales. Se ha establecido que la leche humana, además de otros componentes antivirales, lleva un conjunto de oligosacáridos (oligosacáridos de la leche humana; HMO) que comparten similitudes estructurales con los HBGAs (Bode, 2012) y podrían actuar como antiadhesinas por competencia con los ligandos de patógenos en la mucosa. Esta capacidad de bloqueo por carbohidratos solubles que se asemejan a los ligandos de rotavirus ha sido evidenciada. Se demostró que los HMO inhiben la unión de VP8\* de los genotipos P[6] y P[11] (Yu *et al.*, 2014); la infección de los genotipos P[8] y P[4] es inhibida por el HMO 2'-fucosilactosa, 3'-sialilactosa y 6'-sialilactosa (Laucirica *et al.*, 2017); la LNFPI inhibe la infección de los genotipos P[19], P[4], P[6] y P[8] (Liu *et al.*, 2017), mientras que nosotros demostramos que la LNB inhibe la infección de la cepa Wa *in vitro*. El potencial antiadhesina de este disacárido simple (LNB) es susceptible de ser explotado en estrategias antivirales. La LNB está presente en la leche humana en su forma libre (Balogh *et al.*, 2015), pero principalmente como un bloque de construcción de los HMO tipo I, que son predominantes en la leche humana sobre los HMO tipo II (Lac-NAC), que son característicos de otros mamíferos y primates (Bode, 2012). Por lo tanto, la LNB ha sido considerada el "factor bifido" de la leche humana y muchas especies de bifidobacterias del tracto gastrointestinal infantil tienen la maquinaria enzimática para su metabolismo (Kitaoka, 2012). La LNB no sólo actuaría como un prebiótico estimulante de bifidobacterias, sino también como una antiadhesina viral para contrarrestar la infección por rotavirus. Además, su síntesis es

relativamente sencilla, puede llevarse a cabo de forma enzimática y mediante ingeniería metabólica (Bidart *et al.*, 2016) lo que hace de este disacárido un producto potencial para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales (por ejemplo, fórmulas infantiles mejoradas).

A este respecto, es importante tener en cuenta que se han determinado constantes de alta afinidad (en el rango mM) para los oligosacáridos libres que se vinculan a VP8\* (Böhm *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2018) a fin de obtener buenos competidores, los oligosacáridos multivalentes conjugados parecen ser una buena opción.

La determinación detallada de las interacciones entre los virus y su huésped es crucial para desarrollar estrategias antivirales adecuadas. Hemos definido las interacciones moleculares de P[8] VP8\* de rotavirus humano con su ligando HBGA dando una explicación física de por qué el estado secretor influye en la infectividad del virus. No obstante, los elementos estructurales adicionales, más allá del sitio de unión identificado en VP8\*, son probablemente responsables de modular las interacciones con HBGA dentro de los linajes P[8]. Se está llevando a cabo una disección de los elementos estructurales adicionales de VP8\* que afectan a la unión de los ligandos.



**5. Capítulo III: Estudio seroepidemiológico de la proteína VP8\* de rotavirus pertenecientes a diferentes genotipos P en Valencia, España**



## 5.1. Introducción

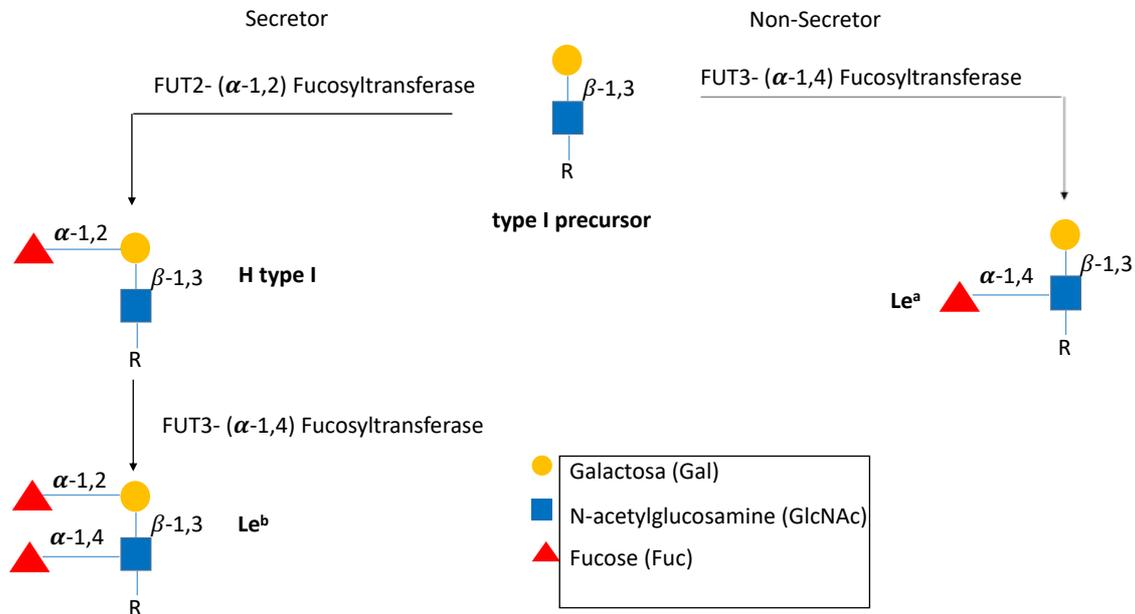
Los rotavirus son el principal agente etiológico de la gastroenteritis viral en bebés y niños pequeños en todo el mundo (Parashar *et al.*, 2006). Rotavirus contiene un genoma de ARN de doble cadena segmentado. La proteína del rotavirus VP7 forma la cubierta de la proteína de la cápsula externa y VP4 forma los picos que sobresalen a través de la cápside externa. VP7 es una glicoproteína que determina el antígeno de tipo G, mientras que VP4 es una proteína sensible a la proteasa que determina el antígeno de tipo P (Buesa & Rodríguez-Díaz, 2007). La clasificación de rotavirus se realiza por su composición genómica y su reactividad antigénica, por lo que la comunidad científica utiliza las proteínas VP7, VP4 y VP6 para clasificarlas. Los rotavirus se clasifican en 9 grupos (A a I) basados en la reactividad inmunológica de la VP6 (proteína viral de la capa media) (Matthijnssens *et al.*, 2012). Los rotavirus de los grupos A, B y C han sido aislados en humanos pero el más prevalente es el grupo A.

Las dos proteínas de la cápside externa, VP7 y VP4, se utilizan para clasificar los rotavirus en los tipos G y P (genotipos y/o serotipos). Hoy en día, podemos contar más de 36 genotipos G y 51 genotipos P diferentes (<https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagénomics/virus-classification/rcwg>). Los genotipos más prevalentes en las infecciones humanas son G1P[8], G2P[4], G3P[8] y G4P[8]. Más recientemente se ha establecido una clasificación utilizando los once segmentos del genoma. Esta nueva clasificación permite un conocimiento más profundo de la epidemiología de rotavirus para estudiar mejor la aparición de reordenamientos genéticos (Matthijnssens *et al.*, 2011).

La proteína de adhesión VP4 se procesa proteolíticamente en dos subunidades, VP5\* y VP8\*. VP8\* está involucrada principalmente en el proceso de adhesión de las células al virus, mientras que VP5\* está involucrada en la translocación del virus al citoplasma de las células infectadas. Durante más de 30 años el ácido siálico fue considerado el receptor de glucósidos para los rotavirus animales (Ramani *et al.*, 2016). Curiosamente, las cepas humanas se consideraban independientes del ácido siálico. El descubrimiento de que la VP8\* de las cepas de rotavirus humano también interactúa con los azúcares, componentes de los antígenos del grupo histo-sanguíneos (HBGAs) rompió el paradigma de la comprensión de la biología de los rotavirus, mostrando que los primeros pasos de la infección de rotavirus humanos están mediados por interacciones específicas entre carbohidratos y virus (Gozalbo-Rovira *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2012). La síntesis de los HBGAs se produce mediante la adición secuencial de monosacáridos a un precursor de disacáridos. El precursor contiene los azúcares galactosa y N-acetilglucosamina (GlcNAc) unidos por un enlace  $\beta$ -1,3 o  $\beta$ -1,4.

Dependiendo del tipo de enlace, los azúcares se clasifican como tipo I que contiene una vinculación de  $\beta$ -1,3 mientras que el tipo II incluye enlaces  $\beta$ -1,4. Para sintetizar el antígeno H se necesita la adición de una fucosa en la posición  $\alpha$ -1,2 por el enzima FUT2. Los antígenos Lewis se sintetizan mediante la adición de un residuo de fucosa en la posición  $\alpha$ -1,4 o  $\alpha$ -1,3 a los precursores terminales GlcNAc o H tipo I y II respectivamente para crear los diferentes antígenos de Lewis <sup>a,b,x,y</sup> (Monedero, Buesa & Rodríguez-Díaz, 2018). El estado secretor está definido por el gen FUT2, los individuos no secretores son aquellos que carecen

de funcionalidad en ambos alelos FUT-2 y, por consiguiente, no expresan estructuras de antígeno H (Figura 30).



**Figura 30.** Vía de biosíntesis de HBGA de tipo I. El estado secretor depende de la presencia del enzima FUT2 que añade secuencialmente una fucosa en la posición  $\alpha$ -1,2 del precursor disacárido. Por otro lado, los individuos no secretores muestran una falta de funcionalidad de este enzima. No son capaces de sintetizar ningún antígeno de tipo H. En este caso, FUT3/4 añade una fucosa en la posición  $\alpha$ -1,3 generando el antígeno Le<sup>a</sup>.

Varios estudios sugirieron que la condición de no secretor reduce la susceptibilidad a las infecciones por RV causadas principalmente por los genotipos de rotavirus P[8], P[4] y P[6] ] (Nordgren *et al.*, 2014; Ramani *et al.*, 2013). Esto es cierto en nuestra zona donde los niños no secretores son menos propensos a sufrir infecciones sintomáticas por rotavirus (Pérez-Ortín *et al.*, 2019).

Los estudios seroepidemiológicos son importantes para dilucidar los diferentes agentes virales y genotipos que están circulando en una zona determinada, por este motivo el objetivo principal de este trabajo fue determinar la prevalencia y el título de anticuerpos séricos frente a un panel de proteínas VP8\* de diferentes

genotipos de rotavirus (P[4], P[6], P[8], P[9], P[11], P[14] y P[25]) en niños y adultos. El segundo objetivo fue determinar si el estado secretor (polimorfismo *FUT2*<sub>G428A</sub>) estaba relacionado con la diferente respuesta de anticuerpos como medida de la susceptibilidad a los distintos genotipos de rotavirus.

## **5.2. Material y métodos**

### **5.2.1. Expresión y purificación de VP8\* recombinante**

La proteína VP8\* de los genotipos P[4], P[6], P[8], P[9], P[11], P[14] y P[25] se produjo como se ha descrito en el capítulo II. Los diferentes clones de *E.coli* fueron cultivados en medio LB con ampicilina y kanamicina (concentración final 100 µg/ml y 25 µg/ml respectivamente) a 37°C con agitación hasta un O.D.<sub>600</sub> = 0.5, luego se indujeron los cultivos con IPTG a una concentración final de 0.1 mM. Los cultivos se mantuvieron a 25°C durante la noche. Después de la inducción, las células se recuperaron por centrifugación a 5.000 x g durante 20 minutos. Las células de 1 litro de medio de cultivo se lisaron en 15 ml de tampón de lisis (PBS con 0,5% de cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma), lisozima 1 mg/ml, 125 U DNAsa I (Thermo Fischer Scientific) y 0,5 mM DTT). Los lisados se centrifugaron a 15.000 x g durante 30 minutos y los sobrenadantes se filtraron a través de filtros de 0,45 µ (Millipore). Las proteínas fueron purificadas en un sistema FPLC Äkta prime (GE, Healthcare) que llevaba una columna GST-Trap (GE, Healthcare) en PBS. El tampón de elución consistía en 50 mM de Tris-HCl, 10 mM de glutatión, pH 8.0. Las proteínas GST::VP8\* fueron desaladas usando una columna de desalinización HiTrap (GE, Healthcare) en el mismo sistema FPLC Äkta prime según el protocolo del fabricante.

### **5.2.2. Recogida de muestras**

Las muestras de suero se obtuvieron de pacientes atendidos en el Hospital Clínico Universitario de Valencia. Se analizaron un total de 88 muestras de suero de adultos y niños. Las muestras fueron de niños de 3,5 años en promedio y de adultos de 58 años en promedio. La información sobre las muestras se muestra

en la tabla 13 (Anexo). Este estudio se realizó con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de Valencia (código H1544010468380). No se obtuvo un consentimiento informado ya que las muestras de sangre humana del Hospital Clínico Universitario de Valencia fueron anonimizadas previamente a su inclusión en el presente estudio. El estudio se realizó siguiendo la declaración de Helsinki sobre los principios éticos para la investigación médica en seres humanos.

### **5.2.3. Determinación de anticuerpos IgG anti-VP8\* en muestras de suero**

Los anticuerpos IgG de 88 muestras de suero se analizaron por ELISA frente a siete genotipos diferentes de VP8\*, P[4], P[6], P[8], P[9], P[11], P[14] y P[25]. Las placas ELISA se recubrieron con cada proteínas GST::VP8\* (P[4], P[6], P[8], P[9], P[11], P[14] y P[25]). Las proteínas purificadas se diluyeron en tampón carbonato/bicarbonato, pH 9,6, a 1 µg/ml. Se añadieron 100 µl de solución a cada pozo y se incubaron durante la noche a 4°C. Paralelamente, los pocillos de las mismas placas se recubrieron con la proteína GST (1 µg/ml) como proteína de referencia para establecer el corte de cada muestra. Las placas se bloquearon añadiendo 200 µl de PBS que contenían 0,05% de Tween 20 (PBS-T) y 3% de BSA durante 1 hora a 37°C. Después del bloqueo, las placas se lavaron tres veces con PBS-T. Las muestras de suero se diluyeron de forma seriada en diluciones 1/2 desde 1/100 a 1/6.400; se añadieron a las placas por triplicado y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de tres lavados se añadió un anticuerpo de cabra anti-IgG humana (1:1.000) conjugado con HRP (Sigma) durante 1 hora a 37°C. Se añadieron 100 µl de o-fenilendiamina (reactivo OPD-Fast, Sigma) a cada pocillo y se detuvo la reacción añadiendo 50 µL de

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e incubando durante 10 minutos. La absorbancia se registró a 492 nm. La dilución se consideró positiva cuando la absorbancia en el pocillo GST::VP8\* era mayor que la misma dilución contra el GST más tres desviaciones estándar.

#### **5.2.4. Determinación de anticuerpos IgG anti-Wa rotavirus en muestras de suero**

Los anticuerpos IgG de las 55 muestras de suero, de las cuáles se disponía del genotipo *FUT2*, fueron analizados por ELISA frente al virus completo de la cepa Wa, un genotipo humano G1P[8]. Las partículas de rotavirus se purificaron como se ha descrito en el capítulo II. Las placas de ELISA se tapizaron con 100 µl por pocillo de una solución que contenía 2,5 µg/ml de virus purificado en tampón carbonato/bicarbonato, pH 9,6. La prueba ELISA se realizó como se ha descrito anteriormente, pero, en este caso, el corte se calculó en pocillos recubiertos con 100 µl de BSA a 1 µg/ml. La dilución se consideró positiva cuando la absorbancia en el pocillo de virus Wa era mayor que la misma dilución contra BSA más tres desviaciones estándar.

#### **5.2.5. Genotipado del estado secretor**

El DNA genómico se extrajo de muestras de suero con un kit comercial (kit de purificación de ADN genómico JetFlex, Genomed, Vilnius, Lituania) siguiendo las instrucciones del fabricante. El polimorfismo *FUT2*<sub>G428A</sub> se determinó mediante PCR y RFLP (Marionneau *et al.*, 2005) con modificaciones. Para detectar este polimorfismo se realizó una PCR anidada. La primera PCR se realizó con los cebadores Fut2\_PCR1 directo (5'-CGG CCA GCA GGG ATC CCC TGG CAG AAC TAC CAC-3') y Fut-2\_PCR1 reverso (5'-CTT TTT GGC ATG CAT GAC ATA

GTC CCC TCC TGG GG-3'). La segunda PCR se realizó con los cebadores FUT-2 G428A directo 5'-GAG GAA TAC CGC GGG GGA GTT AC-3' y FUT-2 G428A reverso (ATG GAC CCC TAC AAA GGG TCC CCG GGG GGC T-3'). La reacción de PCR se realizó con 0,3  $\mu$ M de cada cebador, 0,5  $\mu$ g de DNA genómico, 0,4 mM de dNTPs, 1X Taq tampón de polimerasa con MgCl<sub>2</sub> y 1U de DNA polimerasa (Biotools). El volumen final fue de 50  $\mu$ l. La PCR anidada se realizó con 0,3  $\mu$ M de cada segundo par de cebadores con 1  $\mu$ l de producto de primera amplificación. El volumen final fue de 50  $\mu$ l en la primera amplificación. El protocolo de PCR en ambos casos incluía un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación de PCR, consistentes en 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y 72°C durante 1 minuto. El paso de extensión final incluyó 72°C durante 10 minutos. El producto de PCR se observó en un gel de agarosa (1,5% de agarosa con tampón 0,5x TBE) y las muestras positivas (el tamaño del fragmento esperado es de 300pb) fueron digeridas con *Avall*. La digestión se llevó a cabo con 10  $\mu$ l del producto de la PCR y 1U de *Avall* en un volumen final de 15  $\mu$ l. La digestión se realizó a 37°C durante 2 horas. Los 15  $\mu$ l de producto digerido se cargaron en un gel de agarosa al 2,5%. Para determinar el estado del secretor homocigótico o heterocigótico respecto a la mutación G<sub>428A</sub> en el gen *FUT2*, el tamaño de banda esperado es diferente. La presencia de una sola banda a 50 bp determina el estado secretor homocigoto para *FUT-2* (Se+Se+). La presencia de una doble banda a 200 pb y 50 pb indica el estado secretor heterocigoto (Se+se). Mientras que la banda única a 200 pb indica la condición de no secretor (sese).

### **5.2.6. Análisis estadísticos**

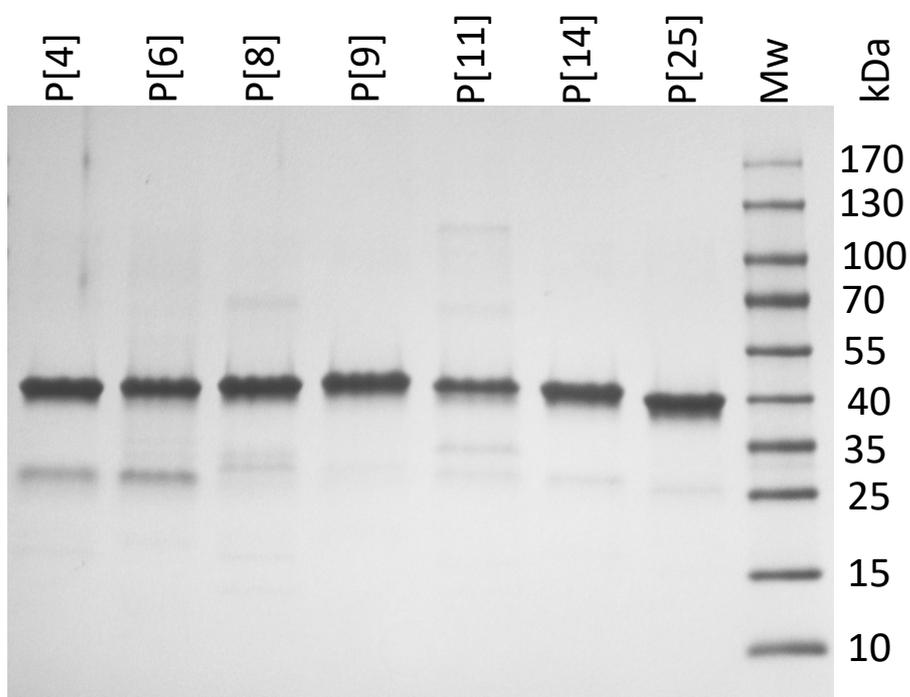
Los datos categóricos se analizaron mediante la prueba  $\chi^2$ . Las diferencias en la respuesta de los anticuerpos a todos los genotipos probados de VP8\* se analizaron mediante una prueba Anova de una sola vía. Las diferencias en los títulos medios y en el número medio de genotipos entre dos grupos se analizaron con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Los análisis se realizaron con el software GraphPad Prism 6 para MacOSX. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de  $p$  inferiores a 0,05.



### 5.3. Resultados

#### 5.3.1. Expresión y purificación de la proteína VP8\* de rotavirus de varios genotipos

La proteína VP8\* de los genotipos P[4], P[6], P[8], P[9], P[11], P[14] y P[25] se produjo en *E. coli* como se describe en el capítulo II. Las proteínas purificadas fueron analizadas por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12% (Figura 31) y confirmadas por Western blot utilizando un anticuerpo anti-GST. La pureza de cada proteína alcanzó el 90 % y sus tamaños eran los esperados.



**Figura 31.** Gel SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie que muestra las diferentes proteínas GST::VP8\* utilizadas en este trabajo. Se indica el genotipo de cada una de las proteínas. Los pesos moleculares (kDa) del marcador (Mw) se indican a la derecha del gel.

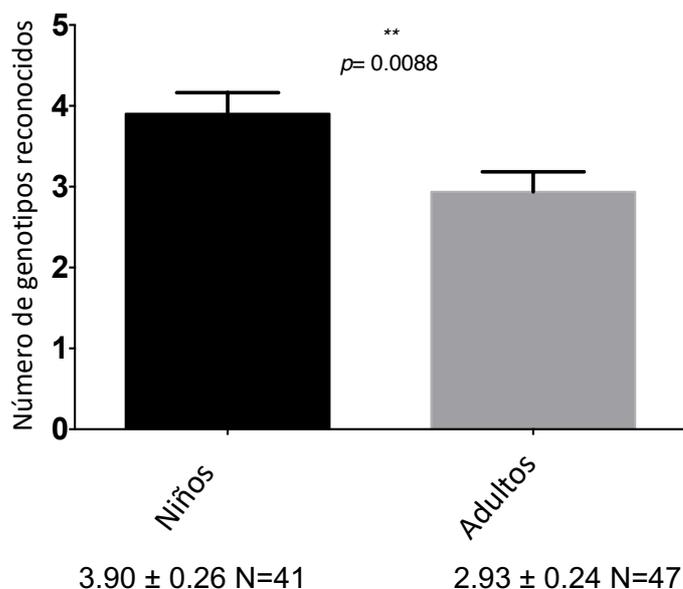
### 5.3.2. Prevalencia de anticuerpos anti VP8\* en suero

El 93% de las muestras resultaron positivas al menos para uno de los antígenos VP8\* (82/88). Se encontró una prevalencia diferente para cada uno de los genotipos, tanto en adultos como en niños (Tabla 15). La mayor prevalencia se encontró en los genotipos P[4] y P[8], mientras que la menor prevalencia se encontró en el genotipo P[11]. Considerando la seroprevalencia total, no se encontraron diferencias entre los niños 88% (36/41) y los adultos 98% (46/47) (Tabla 15). Lo más interesante es que la prevalencia en los genotipos P[4], P[8] y P[11] fue mayor en los niños que en los adultos ( $P < 0,05$ ) (Tabla 14). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los otros genotipos ensayados.

Genotipo VP8*	Adultos	Niños	$\chi^2$ test
P[4]	26/47 (56%)	33/41 (80%)	$P=0.01^*$
P[6]	32/47 (68%)	28/41 (68%)	$P=0.98$
P[8]	23/47 (49%)	29/41 (70%)	$P=0.04^*$
P[9]	16/47 (34%)	22/41 (53%)	$P=0.06$
P[11]	0/47 (0%)	11/41 (27%)	$P=0.0006^*$
P[14]	27/47 (57%)	18/41 (44%)	$P=0.2$
P[25]	14/47 (30%)	20/41 (49%)	$P=0.06$
Cualquier genotipo	46/47 (98%)	36/41 (88%)	$P=0.6$

**Tabla 15.** Seroprevalencia de anticuerpos IgG anti-VP8\* en adultos y niños en Valencia. Los niveles de significación se indican para cada genotipo.  $P < 0.05$  se considera significativo (\*).

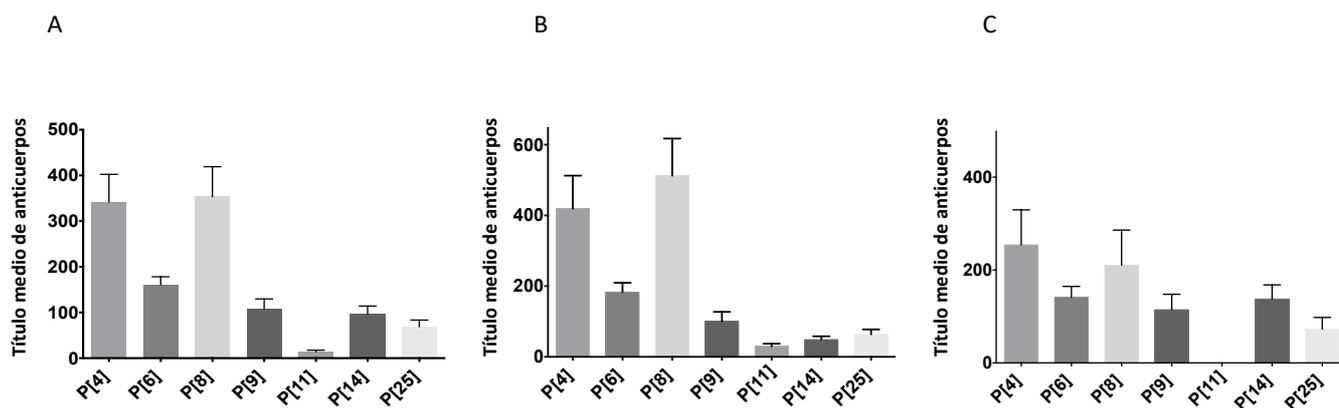
También se estudió el número de genotipos diferentes reconocidos por una sola muestra de suero. Los resultados muestran que las muestras de suero de los niños reconocen un número mayor de genotipos ( $3,90 \pm 0,26$ ) en comparación con los sueros de adultos ( $2,94 \pm 0,24$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 32).



**Figura 32.** La figura muestra el número de genotipos reconocidos por las muestras de suero de niños y adultos. La población infantil reconoció una media de 3,90 genotipos, mientras que la población adulta reconoce un número menor de genotipos que los niños (2,93). Además, el valor  $P$  indica que la diferencia es significativa entre las dos poblaciones ( $P < 0,05$ ).

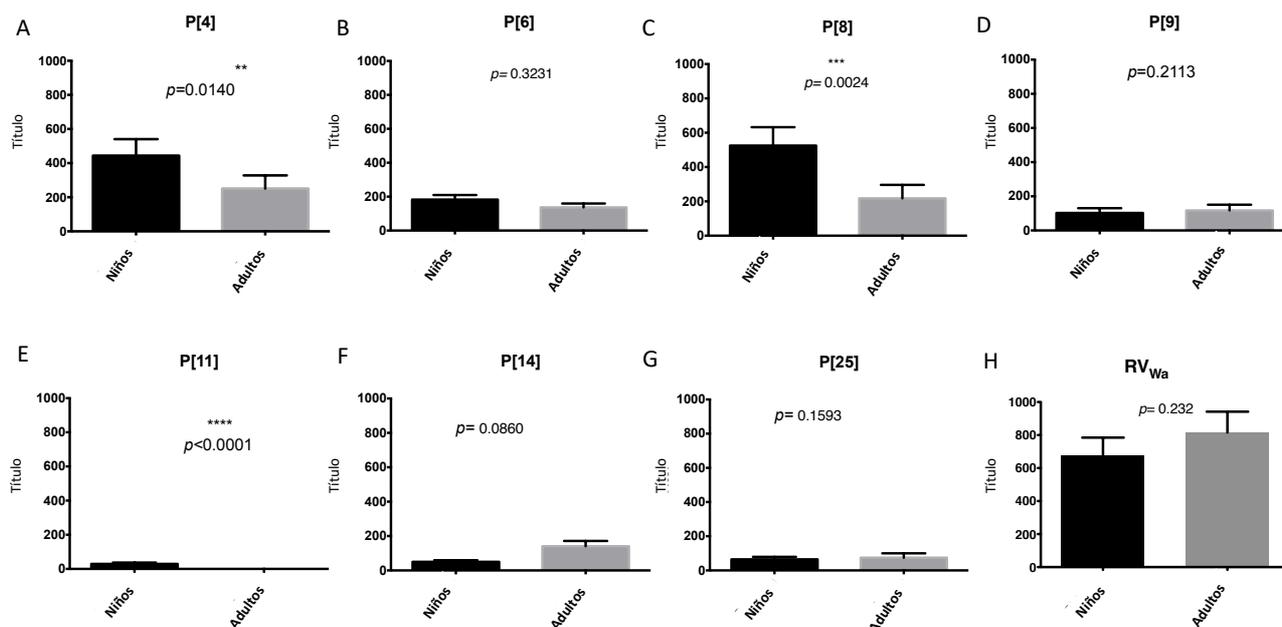
### 5.3.3. Títulos de anticuerpos séricos contra las proteínas VP8\* de rotavirus

Las muestras de suero del presente estudio tenían diferentes títulos de anticuerpos contra cada uno de los diferentes genotipos de VP8\* estudiados (Figura 33A). Los títulos de anticuerpos más altos se detectaron contra los genotipos P[4] y P[8] y los títulos de anticuerpos más bajos contra el genotipo P[11] ( $P < 0,0001$ ). Estas diferencias se observaron tanto en niños como en adultos (Figura 33B y 33C, respectivamente).



**Figura 33.** Valores medios de los títulos de anticuerpos IgG en suero, de adultos y niños (n=88) en A, de sólo niños (n=41) en B y de adultos (n=47) en C, frente a cada genotipo de rotavirus. Las barras de error indican el error estándar de la media (SEM). Se realizaron análisis estadísticos (ANOVA de una vía) que muestran que en las tres poblaciones las P[6], P[9], P[14] y P[25] tienen títulos de anticuerpos más bajos que P[4] y P[8] ( $P < 0,05$  a). Los títulos de anticuerpos más bajos se encontraron en el genotipo P[11] en comparación con cualquiera de los otros genotipos ( $P < 0,0001$  b).

La comparación de los títulos de anticuerpos entre adultos y niños (Figura 34), mostró que los niños tienen títulos más altos frente a los genotipos P[4], P[8] y P[11] en comparación con los adultos ( $P=0,014$ ,  $P=0,0024$  y  $P < 0,0001$  respectivamente). Los títulos de anticuerpos contra los genotipos P[6], P[9] y P[25] fueron similares en ambos grupos, y el título contra el genotipo P[14] fue mayor en el grupo de adultos, pero no significativo. Además, no se encontraron diferencias entre niños y adultos cuando se utilizó como antígeno la partícula viral completa del rotavirus Wa (Figura 34 H).



**Figura 34.** Comparación de los títulos de anticuerpos anti-VP8\* de rotavirus en niños y adultos. De los paneles A a G, se muestra el título de IgG contra cada proteína VP8\*. El eje Y representa el título medio de IgG alcanzado en las muestras de suero de adultos o niños contra la proteína VP8\*. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Sólo para P[4], P[8] y P[11] las diferencias obtenidas entre adultos y niños fueron estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ). El panel H muestra los resultados utilizando la partícula entera de rotavirus de la cepa Wa, una cepa P[8].

### 5.3.4. Estado secretor y respuesta de los anticuerpos a las proteínas VP8\* de rotavirus

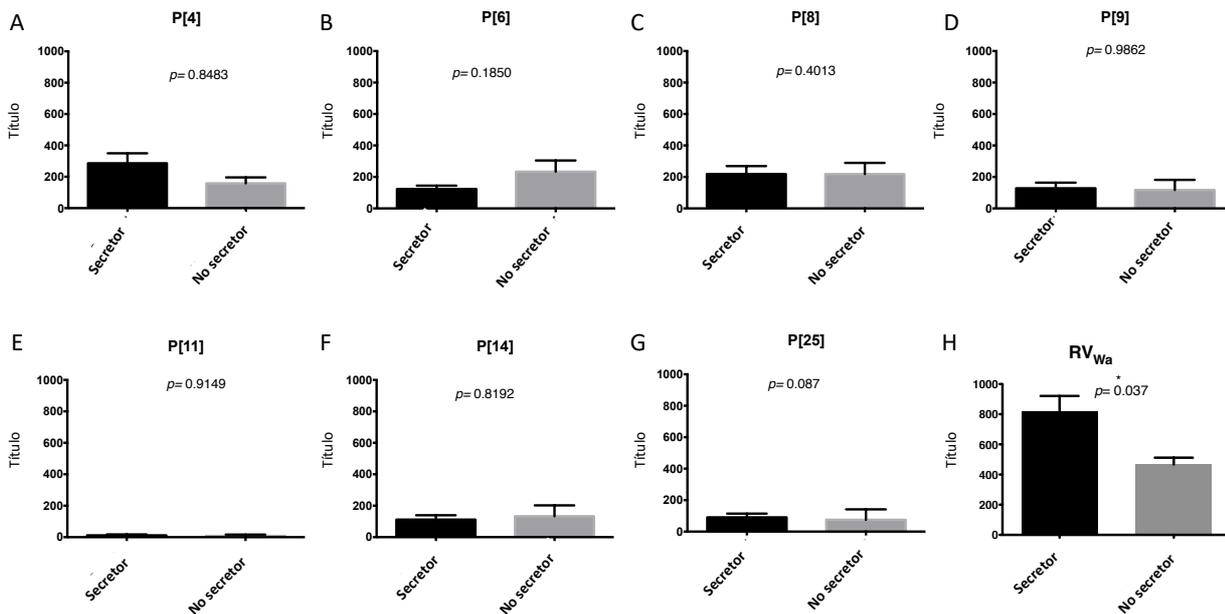
El DNA genómico se extrajo directamente de las muestras de suero y se pudo determinar el genotipo *FUT2* en 55 de ellas. Las 33 muestras restantes no presentaban suficiente DNA o su calidad era insuficiente para permitir el genotipado. La tabla 1 del Anexo muestra una compilación de la respuesta de los anticuerpos y el estado secretor de cada una de las muestras analizadas. De las 55 muestras, 43 fueron secretores positivos (78%) y 12 fueron secretores negativos (21%); estos porcentajes son similares a los publicados anteriormente por nosotros para la población general en el área de estudio (Pérez-Ortín *et al.*, 2019; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2017). Se establecieron comparaciones para estudiar las diferencias en la prevalencia (Tabla 16), de anticuerpos (Figura 35)

y en el número de genotipos diferentes reconocidos entre secretores y no secretores (Figura 36). Curiosamente, el genotipo P[25] mostró una mayor prevalencia en los secretores en comparación con los no secretores ( $P=0,045$ ). Los demás genotipos mostraron frecuencias similares entre estas dos poblaciones (Tabla 16).

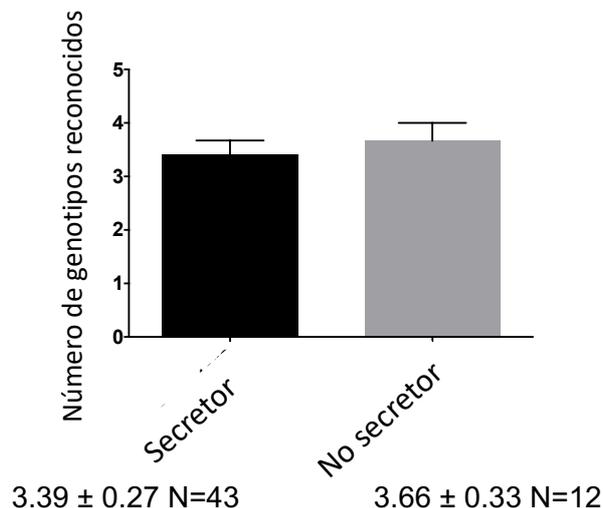
Genotipo VP8*	Secretor	No-secretor	$\chi^2$ test
P[4]	28/43 (65%)	10/12 (83%)	$P=0.22$
P[6]	26/43 (60%)	9/12 (75%)	$P=0.35$
P[8]	23/43 (53%)	9/12 (75%)	$P=0.18$
P[9]	20/43 (46%)	6/12 (50%)	$P=0.83$
P[11]	4/43 (9%)	1/12 (8.3%)	$P=0.93$
P[14]	24/43 (56%)	6/12 (50%)	$P=0.72$
P[25]	21/43 (49%)	2/12 (16%)	$P=0.045^*$
Ningún genotipo	39/43 (90%)	12/12 (100%)	$P=0.6$

**Tabla 16.** Seroprevalencia de las proteínas anti-rotavirus VP8\* en individuos secretores y no secretores en Valencia. Los niveles de significación se indican para cada grupo genético.  $P < 0.05$  se considera significativo (\*).

La comparación de los títulos de anticuerpos entre secretores y no secretores no mostró ninguna diferencia entre ambos grupos (Figura 35). Además, los genotipos reconocidos por cada muestra de suero en la población de secretores ( $3,39 \pm 0,28$ ) y no secretores ( $3,66 \pm 0,33$ ) no mostraron diferencias significativas ( $P=0,626$ ) (Figura 36). Curiosamente, cuando se utilizó como antígeno la partícula viral completa de la cepa Wa de rotavirus, una cepa P[8], en los experimentos de ELISA, se encontraron diferencias significativas entre los secretores y los no secretores ( $P=0,037$ ) (Figura 35 H).



**Figura 35.** Relación entre el estado secretor y el título de anticuerpos frente a cada genotipo de VP8\*, paneles A a G. Los datos analizados incluyen 43 individuos secretores y 12 no secretores. Se realizaron análisis estadísticos (U Mann Whitney a muestras no apareadas) para determinar las diferencias entre los títulos de anticuerpos. El panel H muestra los resultados utilizando la partícula entera de rotavirus de la cepa Wa, una cepa P[8]. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Las muestras no mostraron diferencias significativas entre estas dos poblaciones para las proteínas VP8\* ( $P > 0,05$ ), pero si se encontraron diferencias significativas ( $P = 0,037$ ) cuando se utilizó la partícula de rotavirus completa (panel H).



**Figura 36.** Número de genotipos reconocidos por los anticuerpos séricos. En la población secretora ( $n = 43$ ) los datos muestran que estas muestras de suero contienen anticuerpos contra 3,3 genotipos como media. Las muestras de suero de poblaciones no secretoras ( $n = 12$ ) pudieron reconocer 3,6 genotipos. No se observaron diferencias significativas entre el grupo secretor y no secretor ( $P > 0,05$ ). Las barras de error representaban el error medio estándar (SEM).



## 5.4. Discusión

Los rotavirus son una de las principales causas de gastroenteritis aguda en niños menores de 5 años en todo el mundo y son responsables de aproximadamente 128.000 muertes por año (Troeger *et al.*, 2018). Su prevalencia es similar en los países desarrollados y en desarrollo, pero la mayoría de las muertes se producen en los países en desarrollo, donde no se dispone de vacunas contra el rotavirus o éstas son menos eficaces que en los países desarrollados (Jonesteller *et al.*, 2017). En el presente estudio se analizó la reactividad de 88 muestras de suero de adultos y niños frente a siete proteínas VP8\* de rotavirus diferentes de genotipos P, algunos de genotipos de rotavirus comunes, P[4], P[6], P[8] y P[9] pero otras de genotipos no comunes como P[11], P[14] y P[25] (Sadiq *et al.*, 2018). Hasta donde sabemos, ésta es la primera vez que se han utilizado siete genotipos diferentes de proteína VP8\* en un estudio seroepidemiológico, proporcionando una alta capacidad de detección.

Nuestro estudio revela la presencia de anticuerpos IgG séricos frente a todos los genotipos evaluados, lo que indica que la exposición a rotavirus es habitual en todas las etapas de edad. Los genotipos G más comunes distribuidos por todo el mundo están representados por G1, G2, G3, G4, G9 y G12 en combinación con la mayoría de P[8] y P[4] (aproximadamente el 88%) (Iturriza-Gómara *et al.*, 2009). Estos genotipos son responsables de casi el 90% de las infecciones por rotavirus a nivel mundial (Sadiq *et al.*, 2018) y también en nuestra área de estudio (Pérez-Ortín *et al.*, 2019). En dos publicaciones recientes sobre la epidemiología molecular del rotavirus humano en Valencia (España), se demostró que el 98,5% de las muestras procedían del genotipo P[8] y sólo el 1,5% pertenecía al genotipo P[4] (Pérez-Ortín *et al.*, 2019). Ninguno de los otros genotipos ensayados en el

presente estudio se encontró en muestras clínicas (P[6], P[9], P[11], P[14], P[25]). Por consiguiente, los resultados del presente estudio muestran una mayor prevalencia y títulos de los genotipos P[8] y P[4]. Curiosamente, el genotipo P[11] sólo fue reconocido por las muestras de suero de los niños, lo que refuerza la evidencia de que el genotipo P[11] tiene una mayor restricción de edad que otros genotipos, probablemente debido a la capacidad de este genotipo para reconocer los receptores no fucosilados (Liu *et al.*, 2013).

Se encontraron anticuerpos frente a todos los genotipos ensayados, lo que indica que, aunque no se encuentren en las muestras clínicas, estos virus también circulan en la población a nivel subclínico. Algunos de los genotipos menos frecuentes, como el P[11], el P[14] y el P[25], se consideran cepas reordenadas entre los rotavirus animales y humanos o incluso se transmiten directamente de animales a humanos (Santos & Hoshino, 2005). Este hecho podría explicar una menor eficacia biológica en el huésped humano causando infecciones menos severas o asintomáticas.

Los antígenos histo-sanguíneos (HBGAs) se encuentran en la mucina gástrica y en la superficie de las células epiteliales del intestino. Muchas investigaciones han demostrado que los VP8\* de rotavirus son capaces de reconocer diferentes HBGAs en un genotipo dependiendo de la forma (Monedero, Buesa & Rodríguez-Díaz, 2018). Los genotipos P[9] y P[14] pertenecen al genogrupo III y son capaces de reconocer el antígeno del grupo sanguíneo A (Azad *et al.*, 2018). El genotipo P[19], un genotipo que infecta a los cerdos y a los humanos, pertenece al genogrupo II y se une al antígeno H y al núcleo de mucina tipo 2 (Liu *et al.*, 2017). De la misma manera, P[4], P[6] y P[8] que también pertenecen al genogrupo II, son capaces de reconocer los antígenos relacionados con el tipo

H y el precursor del tipo I (Hu *et al.*, 2018; Gozalbo-Rovira *et al.*, 2019). Finalmente el genotipo P[11] interactúa con la molécula precursora del antígeno tipo H 2 (Liu *et al.*, 2013). Varios estudios han demostrado una susceptibilidad diferente a las infecciones por rotavirus dependiendo de la capacidad de producir el antígeno H. En un estudio epidemiológico recientemente realizado en la misma región geográfica se demostró que el 98% de las muestras clínicas pertenecían a niños secretores, lo que indica que las infecciones por rotavirus de los genotipos P[8] y P[4] son más frecuentemente sintomáticas.

Los resultados serológicos del presente estudio demuestran que los títulos de anticuerpos frente a todos los VP8\* de los diferentes tipos P no dependen del estado secretor. Curiosamente, cuando se utilizó la partícula completa de rotavirus Wa, se encontraron títulos significativamente más altos frente a rotavirus en los secretores, en comparación con los no secretores. Estos datos confirman resultados de otro estudio en el que se encontraron títulos más altos frente a rotavirus en individuos secretores en Suecia (Nordgren *et al.*, 2014). Es importante mencionar que las proteínas estructurales y no estructurales como VP2, VP6 y NSP2 son inmunodominantes (Colomina *et al.*, 1998), mientras que VP8\* es poco reconocida por los anticuerpos séricos (Svensson *et al.*, 1987). Estas diferencias en la inmunodominancia podrían explicar por qué las diferencias entre secretores y no secretores sólo pueden observarse cuando se utiliza como antígeno la partícula viral completa, que contiene VP2 y VP6 (además de VP4 y VP7), para determinar los títulos de anticuerpos. Estos resultados son muy pertinentes, en el contexto del desarrollo de la vacuna, ya que se está elaborando una vacuna de la subunidad VP8\* (Groome *et al.*, 2017). Las vacunas comunes como Rotarix (G1P[8]) y RotaTeq (G1-G4 P[8]) protegen

contra una amplia gama de genotipos de rotavirus G y P, incluso contra los que no están incluidos en las vacunas (Burnett *et al.*, 2020). Esto podría deberse a la inmunidad cruzada frente a las proteínas inmunodominantes VP6 y VP2 que están más conservadas en los rotavirus del grupo A, independientemente de los genotipos G y P (Buesa & Rodríguez-Díaz, 2007).

Esto podría explicar también el nivel de protección alcanzado con la vacuna Rotavac, que está compuesta por un genotipo G9P[11] (Ella *et al.*, 2019). En cuanto a la vacuna de la subunidad VP8\*, se ha demostrado que VP8\* puede producir anticuerpos neutralizantes y protectores (Ruggeri & Greenberg, 1991; Gil *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2019). Sin embargo, también se ha demostrado que la protección es homotípica (Gil *et al.*, 2000), lo que indica que esta vacuna sólo podría proteger frente a rotavirus portadores de los genotipos incluidos en la formulación. Por otra parte, una de las ventajas de la vacuna de la subunidad VP8\* es que se administra por vía parenteral, lo que evita las diferencias de eficacia de la vacuna observadas entre los secretores y los no secretores (Groome *et al.*, 2017).

Nuestro grupo de investigación ha dilucidado recientemente las bases moleculares de las interacciones del antígeno P[8]::H y hemos demostrado que rotavirus puede unirse tanto al antígeno H como a su precursor (H-tipo I, Lacto-N-Biosa) pero esta interacción es más débil cuando falta la fucosa (Gozalbo-Rovira *et al.*, 2019), lo que refuerza la idea de que el estado secretor es un factor clave del huésped en las infecciones por rotavirus. Además, cuando se comparó el sitio de unión de VP8\* entre diferentes genotipos y linajes se encontró que la VP8\* de la vacuna de Rotarix posee una mutación (L167F) que interrumpe el bolsillo de unión, lo que explica la atenuación de esta cepa (Gozalbo-Rovira *et*

*al.*, 2019). Más sorprendentemente, encontramos diferencias significativas en la prevalencia de anticuerpos contra el genotipo P[25] en secretores y no secretores. Se sabe que este genotipo se une al antígeno del grupo sanguíneo A (Gozalbo-Rovira *et al.*, 2019). La presencia del antígeno del grupo A depende de la enzima A codificada en el locus ABO. La enzima A utiliza el antígeno H como sustrato, lo que significa que los individuos secretores negativos son incapaces de sintetizar el antígeno del grupo sanguíneo A en sus mucosas, explicando la menor susceptibilidad de los no secretores a un virus que se une al antígeno A en lugar del antígeno H.

Como conclusión, mostramos aquí la utilidad de los estudios seroepidemiológicos para comprender la circulación de los genotipos de rotavirus comunes (P[4] y P[8]) y no comunes (P[6], P[9], P[11], P[14], P[25]) en una población determinada y demostramos por primera vez una relación entre el estado secretor y la susceptibilidad a los rotavirus del genotipo P[25].



## 6. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos a lo largo de todo el proyecto podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. Las partículas subvirales P y las partículas pseudovíricas (VLPs) de norovirus proporcionan una herramienta adecuada para estudiar las interacciones entre los norovirus y el hospedador.
2. El epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal 3C3G3 es conformacional y está formado por los aminoácidos P245, E247, I389, Q390, R397, R435, G443, Y444, P445, N446, y D448 de la variante GII.4 Den Haag\_2006b.
3. El anticuerpo monoclonal 3C3G3 no reconoce las variantes de GII.4 cronológicamente anteriores, VA387\_1996, 2000 y 2004.
4. De los 11 aminoácidos que forman el epítipo 3C3G3, únicamente los residuos R397 y D448 difieren las variantes de norovirus reconocidas y no reconocidas por el anticuerpo.
5. La mutagénesis de los dos residuos R397 y D448 en la variante GII.4\_VA387\_1996 permiten que esta variante sea reconocida por el anticuerpo 3C3G3 confirmando la participación de estos dos residuos en el epítipo conformacional.
6. El residuo R397 está implicado en el reconocimiento de norovirus GII.4 a los antígenos histo-sanguíneos.
7. La proteína VP8\* de rotavirus del genotipo P[8] reconoce tanto el antígeno H1 como su precursor, la lacto-N-biosa.
8. Tanto la lacto-N-biosa como su análogo estructural la galacto-N-biosa son capaces de bloquear la unión de la VP8\* a los glicanos lacto-N-biosa y

- antígeno H1. Además, la lacto-N-biosa es capaz de bloquear la infectividad de rotavirus en células MA104.
9. El sitio de unión de la proteína VP8\* descrito mediante técnicas cristalográficas está preformado y está compuesto por los aminoácidos W81, L167, K168, Y169, G170, G171, R172, W174, T184, T185, R209, E212 y N216 situados entre las hojas beta  $\beta$ 9- $\beta$ 10 y la hélice  $\alpha$ 1.
  10. La mayoría de contactos entre el antígeno H1 y el sitio de unión se establecen con la galactosa y la N-acetil-glucosamina con una participación muy escasa de la fucosa.
  11. La afinidad de la proteína VP8\* de la variante clínica del genotipo P[8] es dos veces mayor por el antígeno H que por su precursor. Esta diferente afinidad se puede explicar por un mejor posicionamiento de los residuos galactosa y N-acetil-glucosamina en el sitio de unión cuando la fucosa está presente, así como por las interacciones directas (aunque escasas) entre la fucosa y los aminoácidos R209 y Q2012.
  12. Diferentes linajes dentro del genotipo P[8] presentan diferentes afinidades por el antígeno H1 y la lacto-N-biosa. Estas diferencias se pueden explicar por cambios sutiles (I173V) en un bucle cercano al sitio de unión que posicionan de forma ligeramente diferente el sitio de unión.
  13. El estudio serológico llevado a cabo muestra la presencia de anticuerpos IgG séricos frente a la VP8\* de los genotipos P[4], P[6], P[8], P[9], P[11], P[14] y P[25] en la población de estudio.
  14. La prevalencia y el título de anticuerpos es mayor en la población infantil que en los adultos para los genotipos P[4], P[8] y P[11].

15. La población pediátrica presenta reactividad frente a un mayor número de genotipos de VP8\* que la población adulta.
16. Existe una mayor prevalencia de anticuerpos frente a la VP8\* del genotipo P[25] en secretores que en no secretores.
17. Los individuos secretores presentan un mayor título de anticuerpos frente a rotavirus de la cepa Wa (G1 P[8]) que los individuos no secretores.
18. No existen diferencias significativas en los títulos de anticuerpos frente a la proteína VP8\* de los diferentes genotipos de rotavirus entre secretores y no secretores.



## 7. Anexo

**Tabla 1.** Niveles de títulos de anticuerpos IgG contra cada VP8\* de las muestras de suero utilizadas. El estado secretor se indica en la última columna, Se+Se+: homocigótico positivo; Se+se-: heterocigótico positivo; se-se-: no secretor; ND: no determinado.

Muestra	Edad	P[4]	P[6]	P[8]	P[9]	P[11]	P[14]	P[25]	Estado secretor
1	3	0	0	0	100	0	0	0	ND
2	3	400	0	400	0	0	0	0	Se+se-
3	3	100	100	400	200	0	200	400	Se+se-
4	3	0	0	0	0	0	0	0	ND
5	3	400	0	0	100	0	100	100	se-se-
6	3	200	100	800	0	0	100	100	Se+se-
7	3	200	0	800	100	100	0	0	se-se-
8	3	200	0	1600	100	0	100	0	Se+Se+
9	3	100	0	3200	100	0	100	0	se-se-
10	4	0	0	0	100	0	0	100	Se+Se+
11	4	0	0	200	100	100	0	100	Se+Se+
12	4	400	0	400	100	0	0	0	Se+se-
13	4	100	0	0	800	0	200	400	Se+se-
14	4	400	100	800	100	0	0	100	Se+se-
15	5	0	0	0	0	0	0	0	Se+se-
16	5	100	100	0	0	0	0	0	ND
17	2	400	200	400	0	0	100	100	Se+se
18	2	400	0	0	400	0	0	100	Se+se
19	3	800	200	1600	400	0	400	200	ND
20	3	800	100	400	0	0	400	0	Se+Se+
21	4	400	200	0	800	0	400	400	Se+Se+
22	4	1600	100	800	0	0	800	100	Se+Se+
23	4	0	100	0	0	0	800	0	se-se-
24	5	400	200	100	0	0	0	0	Se+se-
25	5	0	0	0	0	0	400	0	ND
26	5	200	400	100	0	0	0	0	se-se-
27	3	200	0	0	0	0	0	0	ND
28	3	0	400	100	0	0	0	0	se-se-
29	4	0	200	0	0	0	0	0	ND
30	4	0	100	0	100	0	100	0	ND
31	5	0	0	0	0	0	0	0	ND
32	4	100	800	400	800	0	400	800	se-se-
33	5	200	100	0	0	0	100	100	Se+se-
34	5	100	0	100	0	0	0	0	Se+se-
35	2	0	100	200	0	0	0	0	Se+se-

36	4	0	0	0	0	0	0	0	Se+Se+
37	1	200	100	100	0	0	0	0	ND
38	4	0	100	0	0	0	0	0	Se+Se+
39	3	400	0	0	0	0	100	0	ND
40	2	0	0	0	0	0	0	0	Se+Se+
41	3	0	100	0	0	0	0	0	ND
42	25	0	400	0	0	0	0	0	Se+se-
43	28	0	100	100	0	0	100	0	Se+se-
44	33	100	400	400	800	0	200	200	Se+se-
45	35	400	200	100	0	0	100	0	Se+Se+
46	40	0	0	0	0	0	0	0	Se+Se+
47	44	100	0	0	100	0	100	0	Se+Se+
48	44	100	100	0	200	0	100	0	Se+Se+
49	51	0	0	0	0	0	100	100	Se+Se+
50	52	0	100	0	0	0	200	100	Se+Se+
51	52	100	0	0	0	0	100	0	Se+se-
52	54	0	200	0	200	0	200	100	ND
53	54	100	100	200	0	0	100	0	se-se-
54	54	400	100	100	0	0	0	0	se-se-
55	54	400	0	800	0	0	100	0	Se+se-
56	55	400	200	200	100	0	800	800	Se+se-
57	55	0	0	100	100	0	100	200	ND
58	56	0	100	0	0	0	0	0	ND
59	61	0	200	100	800	0	100	0	Se+se-
60	61	0	400	0	200	0	100	200	Se+Se+
61	61	100	100	200	200	0	100	0	se-se-
62	62	200	0	200	100	0	0	0	Se+se-
63	72	3200	200	3200	200	0	0	0	ND
64	63	200	400	0	0	0	0	0	Se+Se+
65	63	200	400	0	100	0	0	100	Se+Se+
66	63	100	400	100	100	0	0	0	ND
67	64	200	400	400	0	0	0	0	se-se-
68	64	100	400	100	100	0	0	0	se-se-
69	64	400	200	200	100	0	100	100	ND
70	65	200	200	100	0	0	100	0	ND
71	65	0	400	0	100	100	100	100	Se+Se+
72	66	800	400	400	200	100	100	100	Se+Se+
73	67	1600	100	400	0	0	0	100	Se+se-
74	70	800	100	400	0	0	0	0	ND
75	70	3200	400	1600	200	100	0	100	ND
76	70	1600	100	100	100	200	100	100	Se+Se+
77	71	1600	200	800	0	0	0	100	ND
78	71	800	100	400	0	0	0	0	ND
79	72	800	400	1600	0	0	0	100	ND
80	73	800	400	800	800	0	0	100	ND

81	74	400	400	1600	200	0	100	0	ND
82	75	800	400	1600	200	0	100	0	ND
83	76	100	100	0	0	100	100	100	ND
84	76	100	400	100	0	100	100	100	ND
85	78	0	400	100	0	100	0	0	ND
86	79	0	0	0	0	0	100	0	ND
87	80	400	200	800	0	100	100	100	ND
88	83	400	200	800	0	100	100	0	ND



## 8. Bibliografía

- Allen, D. J., Gray, J. J., Gallimore, C. I., Xerry, J., & Iturriza-Gómara, M. (2008). Analysis of amino acid variation in the P2 domain of the GII-4 Norovirus VP1 protein reveals putative variant-specific epitopes. *PLoS ONE*, 3(1), e1485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001485>
- Allen, D. J., Noad, R., Samuel, D., Gray, J. J., Roy, P., & Iturriza-Gámara, M. (2009). Characterisation of a GII-4 norovirus variant-specific surface-exposed site involved in antibody binding. *Virology Journal*, 6(1), 150. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-150>
- Almand, E. A., Moore, M. D., & Jaykus, L. A. (2017). Norovirus binding to ligands beyond histo-blood group antigens. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02549>
- Amano, J., & Oshima, M. (1999). Expression of the H type 1 blood group antigen during enterocytic differentiation of Caco-2 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274(30), 21209–21216. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.21209>
- Ando, T., Noel, J. S., & Fankhauser, R. L. (2000). Genetic Classification of “Norwalk-like Viruses.” *The Journal of Infectious Diseases*, 181(s2), S336–S348. <https://doi.org/10.1086/315589>
- Arias, C. F., Isa, P., Guerrero, C. A., Méndez, E., Zárate, S., López, T., Espinosa, R., Romero, P., & López, S. (2002). Molecular biology of rotavirus cell entry. *Archives of Medical Research*, 33(4), 356–361. [https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(02\)00374-0](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(02)00374-0)
- Arista, S., Giammanco, G. M., De Grazia, S., Ramirez, S., Lo Biundo, C., Colomba, C., Cascio, A., & Martella, V. (2006). Heterogeneity and Temporal Dynamics of Evolution of G1 Human Rotaviruses in a Settled Population. *Journal of Virology*, 80(21), 10724–10733. <https://doi.org/10.1128/jvi.00340-06>
- Arnold, M., Patton, J. T., & McDonald, S. M. (2009). Culturing, storage, and quantification of rotaviruses. In *Current Protocols in Microbiology* (Issue SUPPL. 15, pp. 15C.3.1-15C.3.24). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc15c03s15>
- Asanaka, M., Atmar, R. L., Ruvolo, V., Crawford, S. E., Neill, F. H., & Estes, M. K. (2005). Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(29), 10327–10332. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408529102>
- Atmar, R. L., Sankaran, B., Prasad, B. V. V., Czako, R., Estes, M. K., & Shanker, S. (2014). Structural Analysis of Determinants of Histo-Blood Group Antigen Binding Specificity in Genogroup I Noroviruses. *Journal of Virology*, 88(11), 6168–6180. <https://doi.org/10.1128/jvi.00201-14>
- Azad, M. B., Wade, K. H., & Timpson, N. J. (2018). FUT2 secretor genotype and susceptibility to infections and chronic conditions in the ALSPAC cohort. *Wellcome Open Research*, 3, 65. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14636.2>
- Bailey, D., Karakasiliotis, I., Vashist, S., Chung, L. M. W., Reese, J., McFadden, N., Benson, A., Yarovinsky, F., Simmonds, P., & Goodfellow, I. (2010). Functional Analysis of RNA Structures Present at the 3' Extremity of the Murine Norovirus Genome: the Variable Polypyrimidine Tract Plays a Role in Viral Virulence. *Journal of Virology*, 84(6), 2859–2870. <https://doi.org/10.1128/jvi.02053-09>
- Balogh, R., Jankovics, P., & Béni, S. (2015). Qualitative and quantitative analysis of N-acetylglucosamine and lacto-N-biose, the two major building blocks of human milk oligosaccharides in human milk samples by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a porous graphitic. *Journal of Chromatography A*, 1422, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.006>
- Bányai, K., László, B., Duque, J., Steele, A. D., Nelson, E. A. S., Gentsch, J. R., & Parashar, U. D. (2012). Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: Insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine*, 30(SUPPL. 1), 111. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.111>
- Battye, T. G. G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H. R., & Leslie, A. G. W. (2011). iMOSFLM: A new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 67(4), 271–281. <https://doi.org/10.1107/S0907444910048675>
- 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(21), 11603–11615. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.21.11603-11615.2003>
- Bidart, G. N., Rodríguez-Díaz, J., Monedero, V., & Yebra, M. J. (2014). A unique gene cluster for the utilization of the mucosal and human milk-associated glycans galacto-N-biose and lacto-N-biose in *Lactobacillus casei*. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/mmi.12678>
- Bidart, G. N., Rodríguez-Díaz, J., & Yebra, M. J. (2016). The extracellular wall-bound  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase from *Lactobacillus casei* is involved in the metabolism of the human milk oligosaccharide lacto-N-triose. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.02888-15>

- Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H., & Ruck, B. J. (1973). Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(73\)92867-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(73)92867-5)
- Black, D. N., Burroughs, J. N., Harris, T. J. R., & Brown, F. (1978). The structure and replication of calicivirus RNA [32]. In *Nature* (Vol. 274, Issue 5671, pp. 614–615). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/274614a0>
- Blackhall, J., Fuentes, A., & Magnusson, G. (1996). Genetic stability of a porcine rotavirus RNA segment during repeated plaque isolation. *Virology*, 225(1), 181–190. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0586>
- Blanchard, H., Yu, X., Coulson, B. S., & von Itzstein, M. (2007). Insight into Host Cell Carbohydrate-recognition by Human and Porcine Rotavirus from Crystal Structures of the Virion Spike Associated Carbohydrate-binding Domain (VP8\*). *Journal of Molecular Biology*, 367(4), 1215–1226. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.01.028>
- Blutt, S. E., Crawford, S. E., Warfield, K. L., Lewis, D. E., Estes, M. K., & Conner, M. E. (2004). The VP7 Outer Capsid Protein of Rotavirus Induces Polyclonal B-Cell Activation. *Journal of Virology*, 78(13), 6974–6981. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.13.6974-6981.2004>
- Blutt, S. E., Kirkwood, C. D., Parreño, V., Warfield, K. L., Ciarlet, M., Estes, M. K., Bok, K., Bishop, R. F., & Conner, M. E. (2003). Rotavirus antigenaemia and viraemia: A common event? *Lancet*, 362(9394), 1445–1449. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14687-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14687-9)
- Bode, L. (2012). Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. In *Glycobiology* (Vol. 22, Issue 9, pp. 1147–1162). Narnia. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws074>
- Böhm, R., Fleming, F. E., Maggioni, A., Dang, V. T., Holloway, G., Coulson, B. S., Von Itzstein, M., & Haselhorst, T. (2015). Revisiting the role of histo-blood group antigens in rotavirus host-cell invasion. *Nature Communications*, 6, 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms6907>
- Buesa, J., Collado, B., López-Andújar, P., Abu-Mallouh, R., Rodríguez Díaz, J., García Díaz, A., Prat, J., Guix, S., Llovet, T., Prats, G., & Bosch, A. (2002). Molecular epidemiology of caliciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8), 2854–2859. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.8.2854-2859.2002>
- Buesa, Javier, & Rodríguez-Díaz, J. (2007). Molecular Virology of Enteric Viruses (with Emphasis on Caliciviruses). In *Viruses in Foods*. [https://doi.org/10.1007/0-387-29251-9\\_3](https://doi.org/10.1007/0-387-29251-9_3)
- Bull, R. A., Eden, J.-S., Luciani, F., McElroy, K., Rawlinson, W. D., & White, P. A. (2012). Contribution of Intra- and Interhost Dynamics to Norovirus Evolution. *Journal of Virology*, 86(6), 3219–3229. <https://doi.org/10.1128/jvi.06712-11>
- Bull, R. A., Tanaka, M. M., & White, P. A. (2007). Norovirus recombination. *Journal of General Virology*, 88(12), 3347–3359. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83321-0>
- Burnett, E., Parashar, U. D., & Tate, J. E. (2020). Global Impact of Rotavirus Vaccination on Diarrhea Hospitalizations and Deaths Among Children &lt;5 Years Old: 2006–2019. *The Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa081>
- Burroughs, J. N., & Brown, F. (1978). Presence of a covalently linked protein on calicivirus RNA. *Journal of General Virology*, 41(2), 443–446. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-41-2-443>
- Carmona-Vicente, N. (2014). *Estudi de la immunogenicitat de norovirus humans i de la seua interacció amb receptors cel·lulars*. Universitat de València.
- Carmona-Vicente, N., Fernández-Jiménez, M., Vila-Vicent, S., Rodríguez-Díaz, J., & Buesa, J. (2016). Characterisation of a household norovirus outbreak occurred in Valencia (Spain). *BMC Infectious Diseases*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1455-9>
- Caul, E. O., & Appleton, H. (1982). The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: An interim scheme for classification. *Journal of Medical Virology*, 9(4), 257–265. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890090403>
- Chang, K.-O., Sosnovtsev, S. S., Belliot, G., Wang, Q., Saif, L. J., & Green, K. Y. (2005). Reverse Genetics System for Porcine Enteric Calicivirus, a Prototype Sapovirus in the Caliciviridae. *Journal of Virology*, 79(3), 1409–1416. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.3.1409-1416.2005>
- Charpilienne, A., Lepault, J., Rey, F., & Cohen, J. (2002). Identification of Rotavirus VP6 Residues Located at the Interface with VP2 That Are Essential for Capsid Assembly and Transcriptase Activity. *Journal of Virology*, 76(15), 7822–7831. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.15.7822-7831.2002>
- Chaudhry, Y., Skinner, M. A., & Goodfellow, I. G. (2007). Recovery of genetically defined murine norovirus in tissue culture by using a fowlpox virus expressing T7 RNA polymerase. *Journal of General Virology*, 88(8), 2091–2100. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82940-0>
- Chen, D., Zeng, C. Q., Wentz, M. J., Gorziglia, M., Estes, M. K., & Ramig, R. F. (1994). Template-dependent, in vitro replication of rotavirus RNA. *Journal of Virology*, 68(11), 7030–7039. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.11.7030->

- Chen, Dayue, Barros, M., Spencer, E., & Patton, J. T. (2001). Features of the 3'-consensus sequence of rotavirus mRNAs critical to minus strand synthesis. *Virology*, *282*(2), 221–229. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.0825>
- Chen, Dayue, & Patton, J. T. (1998). Rotavirus RNA Replication Requires a Single-Stranded 3' End for Efficient Minus-Strand Synthesis. *Journal of Virology*, *72*(9), 7387–7396. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.9.7387-7396.1998>
- Chen, R., Neill, J. D., Noel, J. S., Hutson, A. M., Glass, R. I., Estes, M. K., & Prasad, B. V. V. (2004). Inter- and Intra-genus Structural Variations in Caliciviruses and Their Functional Implications. *Journal of Virology*, *78*(12), 6469–6479. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.12.6469-6479.2004>
- Chhabra, P., Graaf, M. de, Parra, G. I., Chan, M. C.-W., Green, K., Martella, V., Wang, Q., White, P. A., Katayama, K., Vennema, H., Koopmans, M. P. G., & Vinjé, J. (2019). Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *Journal of General Virology*, 1–14, jgv001318. <https://doi.org/10.1099/JGV.0.001318>
- Choi, J.-M., Hutson, A. M., Estes, M. K., & Prasad, B. V. V. (2008). Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(27), 9175–9180. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803275105>
- Ciarlet, M., & Estes, M. K. (1999). Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. *Journal of General Virology*, *80*(4), 943–948. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-4-943>
- Ciarlet, M., & Estes, M. K. (2001). Interactions between rotavirus and gastrointestinal cells. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 4, Issue 4, pp. 435–441). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00232-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00232-0)
- Ciarlet, M., Ludert, J. E., Iturriza-Gómara, M., Liprandi, F., Gray, J. J., Desselberger, U., & Estes, M. K. (2002). Initial Interaction of Rotavirus Strains with N-Acetylneuraminic (Sialic) Acid Residues on the Cell Surface Correlates with VP4 Genotype, Not Species of Origin. *Journal of Virology*, *76*(8), 4087–4095. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.8.4087-4095.2002>
- Clarke, I. N., Viljoen, G. J., Liu, B. L., & Lambden, P. R. (1999). Identification of further proteolytic cleavage sites in the Southampton calicivirus polyprotein by expression of the viral protease in *E. coli*. *Journal of General Virology*, *80*(2), 291–296. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-2-291>
- Colomina, J., Gil, M. T., Codoñer, P., & Buesa, J. (1998). Viral proteins VP2, VP6, and NSP2 are strongly precipitated by serum and fecal antibodies from children with rotavirus symptomatic infection. *Journal of Medical Virology*, *56*(1), 58–65. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199809\)56:1<58::AID-JMV10>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199809)56:1<58::AID-JMV10>3.0.CO;2-S)
- Crawford, S. E., Mukherjee, S. K., Estes, M. K., Lawton, J. A., Shaw, A. L., Ramig, R. F., & Prasad, B. V. V. (2001). Trypsin Cleavage Stabilizes the Rotavirus VP4 Spike. *Journal of Virology*, *75*(13), 6052–6061. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.13.6052-6061.2001>
- da Silva, M. F. M., Gómez, M. M., Rose, T. L., Volotão, E. de M., Carvalho-Costa, F. A., Bello, G., & Leite, J. P. G. (2013). VP8 \* P[8] lineages of group A rotaviruses circulating over 20years in Brazil: Proposal of six different sub-lineages for P[8]-3 clade. *Infection, Genetics and Evolution*, *16*, 200–205. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.01.004>
- Dastjerdi, A. M., Green, J., Gallimore, C. I., Brown, D. W. G., & Bridger, J. C. (1999). The bovine Newbury agent-2 is genetically more closely related to human SRSVs than to animal caliciviruses. *Virology*, *254*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9514>
- Daughenbaugh, K. F., Fraser, C. S., Hershey, J. W. B., & Hardy, M. E. (2003). The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *The EMBO Journal*, *22*(11), 2852–2859. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg251>
- Debbink, K., Lindesmith, L. C., Donaldson, E. F., Costantini, V., Beltramello, M., Corti, D., Swanstrom, J., Lanzavecchia, A., Vinjé, J., & Baric, R. S. (2013). Emergence of new pandemic GII.4 Sydney norovirus strain correlates with escape from herd immunity. *Journal of Infectious Diseases*, *208*(11), 1877–1887. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit370>
- Desselberger, Ulrich. (2019). Caliciviridae other than noroviruses. In *Viruses*. <https://doi.org/10.3390/v11030286>
- Desselberger, Ulrich, & Gray, J. (2009). Viral gastroenteritis. In *Medicine* (Vol. 37, Issue 11, pp. 594–598). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2009.08.005>
- Dolin, R., Blacklow, N. R., Wyatt, R. G., & Sereno, M. M. (1972). Detection and localization of viruses in human fetal intestinal organ cultures by immunofluorescence. *Infection and Immunity*, *6*(6), 958–964. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4344634>
- Dolin, Raphael, Blacklow, N. R., Dupont, H., Buscho, R. F., Wyatt, R. G., Kasel, J. A., Hornick, R., & Chanock, R. M. (1972). Biological Properties of Norwalk Agent of Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *140*(2), 578–583. <https://doi.org/10.3181/00379727-140-36508>
- Dormitzer, P. R., Sun, Z. Y. J., Wagner, G., & Harrison, S. C. (2002). The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *EMBO Journal*, *21*(5), 885–897. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.885>

- Dunham, D. M., Jiang, X., Berke, T., Smith, A. W., & Matson, D. O. (1998). Genomic mapping of a calicivirus VPg. *Archives of Virology*, 143(12), 2421–2430. <https://doi.org/10.1007/s007050050471>
- Ella, R., Babji, S., Ciarlet, M., Blackwelder, W. C., & Vadrevu, K. M. (2019). A randomized, open-labelled, non-inferiority phase 4 clinical trial to evaluate the immunogenicity and safety of the live, attenuated, oral rotavirus vaccine, ROTAVAC® in comparison with a licensed rotavirus vaccine in healthy infants. *Vaccine*, 37(31), 4407–4413. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.05.069>
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(4), 486–501. <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>
- Erickson, A. K., Jesudhasan, P. R., Mayer, M. J., Narbad, A., Winter, S. E., & Pfeiffer, J. K. (2018). Bacteria Facilitate Enteric Virus Co-infection of Mammalian Cells and Promote Genetic Recombination. *Cell Host and Microbe*, 23(1), 77–88.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.11.007>
- Estes, M. K., & Kapikian, A. Z. (2007). *Rotaviruses* (K. DM, P. Howley, D. Griffin, R. Lamb, M. Martin, B. Roizman, & S. Straus (eds.); 2nd ed.). Williams and Wilkins, 1917-1974.
- Estes, M. K., Prasad, B. V., & Atmar, R. L. (2006). Noroviruses everywhere: has something changed? *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19(5), 467–474. <https://doi.org/10.1097/01.qco.0000244053.69253.3d>
- Ettayebi, K., Crawford, S. E., Murakami, K., Broughman, J. R., Karandikar, U., Tenge, V. R., Neil, F. H., Blutt, S. E., Zeng, X.-L., Qu, L., Kou, B., Opekun, A. R., Burrin, D., Graham, D. Y., Ramani, S., Atmar, R. L., & Estes, M. K. (2016). Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science*, 353(6306). <https://doi.org/10.1126/science.aaf5080>
- Ettayebi, K., & 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(21), 11790–11797. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.21.11790-11797.2003>
- Evans, P. R., & Murshudov, G. N. (2013). How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(7), 1204–1214. <https://doi.org/10.1107/S0907444913000061>
- Fankhauser, R. L., Monroe, S. S., Noel, J. S., Humphrey, C. D., Bresee, J. S., Parashar, U. D., Ando, T., & Glass, R. I. (2002). Epidemiologic and Molecular Trends of “Norwalk-like Viruses” Associated with Outbreaks of Gastroenteritis in the United States. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(1), 1–7. <https://doi.org/10.1086/341085>
- Feng, N., Hu, L., Ding, S., Sanyal, M., Zhao, B., Sankaran, B., Ramani, S., McNeal, M., Yasukawa, L. L., Song, Y., Venkataram Prasad, B. V., & Greenberg, H. B. (2019). Human VP8\* mAbs neutralize rotavirus selectively in human intestinal epithelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, 129(9), 3839–3851. <https://doi.org/10.1172/JCI128382>
- Fernandez-Vega, V., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., King, A. D., Mitra, T., Gorbalenya, A., & Green, K. Y. (2004). Norwalk Virus N-Terminal Nonstructural Protein Is Associated with Disassembly of the Golgi Complex in Transfected Cells. *Journal of Virology*, 78(9), 4827–4837. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.9.4827-4837.2004>
- Flewett, T. H., Bryden, A. S., & Davies, H. (1973). Letter: Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(73\)92760-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(73)92760-8)
- Freitas, F., Temudo, M., & Reis, M. A. M. (2005). Microbial population response to changes of the operating conditions in a dynamic nutrient-removal sequencing batch reactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 28(3), 199–209. <https://doi.org/10.1007/s00449-005-0029-9>
- Gil, M. T., De Souza, C. O., Asensi, M., & Buesa, J. (2000). Homotypic protection against rotavirus-induced diarrhea in infant mice breast-fed by dams immunized with the recombinant VP8\* subunit of the VP4 capsid protein. *Viral Immunology*, 13(2), 187–200. <https://doi.org/10.1089/vim.2000.13.187>
- Glass, P. J., White, L. J., Ball, J. M., Leparco-Goffart, I., Hardy, M. E., & Estes, M. K. (2000). Norwalk Virus Open Reading Frame 3 Encodes a Minor Structural Protein. *Journal of Virology*, 74(14), 6581–6591. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.14.6581-6591.2000>
- Gozalbo-Rovira, R., Ciges-Tomas, J. R., Vila-Vicent, S., Buesa, J., Santiso-Bellón, C., Monedero, V., Yebra, M. J., Marina, A., & Rodríguez-Díaz, J. (2019). Unraveling the role of the secretor antigen in human rotavirus attachment to histo-blood group antigens. *PLOS Pathogens*, 15(6), e1007865. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007865>
- Green, K., Chanock, R., & Kapikian, A. (2001). *Human caliciviruses* (Lippincott, Williams and Wilkins (ed.); Fields vir).
- Green, K. Y., Kapikjan, A. Z., Valdesuso, J., Sosnovtsev, S., Treanor, J. J., & Lew, J. F. (1997). Expression and self-assembly of recombinant capsid protein from the antigenically distinct Hawaii human calicivirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(7), 1909–1914. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.7.1909-1914.1997>
- Green, K. Y., Kapikian, A. Z., Valdesuso, J., Sosnovtsev, S., Treanor, J. J., & Lew, J. F. (1997). Expression and self-assembly of recombinant capsid protein from the antigenically distinct Hawaii human calicivirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(7), 1909–1914. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9196224>
- Green, Kim Y., Belliot, G., Taylor, J. L., Valdesuso, J., Lew, J. F., Kapikian, A. Z., & Lin, F.-Y. C. (2002). A predominant role for Norwalk-like viruses as agents of epidemic gastroenteritis in Maryland nursing homes for the elderly. *The*

- Griffin, D. D., Fletcher, M., Levy, M. E., Ching-Lee, M., Nogami, R., Edwards, L., Peters, H., Montague, L., Gentsch, J. R., & Glass, R. I. (2002). Outbreaks of Adult Gastroenteritis Traced to a Single Genotype of Rotavirus. *The Journal of Infectious Diseases*, 185(10), 1502–1505. <https://doi.org/10.1086/340218>
- Groome, M. J., Koen, A., Fix, A., Page, N., Jose, L., Madhi, S. A., McNeal, M., Dally, L., Cho, I., Power, M., Flores, J., & Cryz, S. (2017). Safety and immunogenicity of a parenteral P2-VP8-P[8] subunit rotavirus vaccine in toddlers and infants in South Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(8), 843–853. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30242-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30242-6)
- Guix, S., Asanaka, M., Katayama, K., Crawford, S. E., Neill, F. H., Atmar, R. L., & Estes, M. K. (2007). Norwalk Virus RNA Is Infectious in Mammalian Cells. *Journal of Virology*, 81(22), 12238–12248. <https://doi.org/10.1128/jvi.01489-07>
- Günaydin, G., Nordgren, J., Sharma, S., & Hammarstrom, L. (2016). Association of elevated rotavirus-specific antibody titers with HBGA secretor status in Swedish individuals: The FUT2 gene as a putative susceptibility determinant for infection. *Virus Research*, 211, 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.10.005>
- Hale, A. D., Crawford, S. E., Ciarlet, M., Green, J., Gallimore, C., Brown, D. W. G., Jiang, X., & Estes, M. K. (1999). Expression and Self-Assembly of Grimsby Virus: Antigenic Distinction from Norwalk and Mexico Viruses. *Clinical and Vaccine Immunology*, 6(1).
- Hall, A. J., Lopman, B. A., Payne, D. C., Patel, M. M., Gastañaduy, P. A., Vinjé, J., & Parashar, U. D. (2013). Norovirus disease in the united states. *Emerging Infectious Diseases*, 19(8), 1198–1205. <https://doi.org/10.3201/eid1908.130465>
- Hardy, M. E., White, L. J., Ball, J. M., & Estes, M. K. (1995). Specific proteolytic cleavage of recombinant Norwalk virus capsid protein. *Journal of Virology*, 69(3), 1693–1698. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7853506>
- Herbert, T. P., Brierley, I., & Brown, T. D. K. (1996). Detection of the ORF3 polypeptide of feline calicivirus in infected cells and evidence for its expression from a single, functionally bicistronic, subgenomic mRNA. *Journal of General Virology*, 77(1), 123–127. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-1-123>
- Hoa Tran, T. N., Trainor, E., Nakagomi, T., Cunliffe, N. A., & Nakagomi, O. (2013). Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: Global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. In *Journal of Clinical Virology* (Vol. 56, Issue 3, pp. 269–277). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.11.011>
- Hu, L., Crawford, S. E., Czako, R., Cortes-Penfield, N. W., Smith, D. F., Le Pendu, J., Estes, M. K., & Prasad, B. V. V. (2012). Cell attachment protein VP8\* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature*, 485(7397), 256–259. <https://doi.org/10.1038/nature10996>
- Hu, L., Lasanajak, Y., Estes, M. K., Laucirica, D. R., Atmar, R. L., Ferreón, J. C., Patil, K., Ferreón, A. C. M., Tsoi, P. S., Sankaran, B., Smith, D. F., Prasad, B. V. V., Salmen, W., Ramani, S., Laucirica, D. R., Patil, K., Salmen, W., Ferreón, A. C. M., Tsoi, P. S., ... Prasad, B. V. V. (2018). Glycan recognition in globally dominant human rotaviruses. *Nature Communications*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05098-4>
- Hu, L., Ramani, S., Czako, R., Sankaran, B., Yu, Y., Smith, D. F., Cummings, R. D., Estes, M. K., & Venkataram Prasad, B. V. (2015). Structural basis of glycan specificity in neonate-specific bovine-human reassortant rotavirus. *Nature Communications*, 6(May), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms9346>
- Hu, L., Sankaran, B., Laucirica, D. R., Patil, K., Salmen, W., Ferreón, A. C. M., Tsoi, P. S., Lasanajak, Y., Smith, D. F., Ramani, S., Atmar, R. L., Estes, M. K., Ferreón, J. C., & Prasad, B. V. V. (2018). Glycan recognition in globally dominant human rotaviruses. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05098-4>
- Huang, P., Xia, M., Tan, M., Zhong, W., Wei, C., Wang, L., Morrow, A., Jiang, X., Tan, M., Wang, L., Zhong, W., Xia, M., & Jiang, X. (2012). Spike Protein VP8\* of Human Rotavirus Recognizes Histo-Blood Group Antigens in a Type-Specific Manner. *Journal of Virology*, 86(9), 4833–4843. <https://doi.org/10.1128/JVI.05507-11>
- Hutson, A. M., Atmar, R. L., & Estes, M. K. (2004). Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends in Microbiology*, 12(6), 279–287. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2004.04.005>
- Imbert-Marcille, B. M., Barbé, L., Dupé, M., Le Moullac-Vaidye, B., Besse, B., Peltier, C., Ruvoën-Clouet, N., & Le Pendu, J. (2014). A FUT2 gene common polymorphism determines resistance to rotavirus a of the P[8] genotype. *Journal of Infectious Diseases*, 209(8), 1227–1230. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit655>
- Iturriza-Gómara, M., Dallman, T., Bányai, K., Böttiger, B., Buesa, J., Diedrich, S., Fiore, L., Johansen, K., Koopmans, M., Korsun, N., Koukou, D., Kroneman, A., László, B., Lappalainen, M., Maunula, L., Marques, A. M., Matthijnssens, J., Midgley, S., Mladenova, Z., ... Gray, J. (2011). Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. *Epidemiology and Infection*, 139(6), 895–909. <https://doi.org/10.1017/S0950268810001810>
- Iturriza-Gómara, M., Dallman, T., Bányai, K., Böttiger, B., Buesa, J., Diedrich, S., Fiore, L., Johansen, K., Korsun, N., Kroneman, A., Lappalainen, M., László, B., Maunula, L., Matthijnssens, J., Midgley, S., Mladenova, Z., Poljsak-Prijatelj, M., Pothier, P., Ruggeri, F. M., ... Gray, J. (2009). Rotavirus Surveillance in Europe, 2005–2008: Web-Enabled Reporting and Real-Time Analysis of Genotyping and Epidemiological Data. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(12), 1995–2003. <https://doi.org/10.1093/infdis/jip245>

*Diseases*, 200(s1), S215–S221. <https://doi.org/10.1086/605049>

- Iturriza Gómara, M., Wong, C., Blome, S., Desselberger, U., & Gray, J. (2002). Molecular Characterization of VP6 Genes of Human Rotavirus Isolates: Correlation of Genogroups with Subgroups and Evidence of Independent Segregation. *Journal of Virology*, 76(13), 6596–6601. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.13.6596-6601.2002>
- Jere, K. C., Chaguza, C., Bar-Zeev, N., Lowe, J., Peno, C., Kumwenda, B., Nakagomi, O., Tate, J. E., Parashar, U. D., Heyderman, R. S., French, N., Cunliffe, N. A., & Iturriza-Gómara, M. (2018). Emergence of Double- and Triple-Gene Reassortant G1P[8] Rotaviruses Possessing a DS-1-Like Backbone after Rotavirus Vaccine Introduction in Malawi. *Journal of Virology*, 92(3). <https://doi.org/10.1128/JVI.01246-17>
- 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(11), 6527–6532. <https://doi.org/10.1128/jvi.66.11.6527-6532.1992>
- Jiang, Xi, Wang, M., Wang, K., & Estes, M. K. (1993). Sequence and Genomic Organization of Norwalk Virus. *Virology*, 195(1), 51–61. <https://doi.org/10.1006/VIRO.1993.1345>
- Jones, M. K., Grau, K. R., Costantini, V., Kolawole, A. O., De Graaf, M., Freiden, P., Graves, C. L., Koopmans, M., Wallet, S. M., Tibbetts, S. A., Schultz-Cherry, S., Wobus, C. E., Vinjé, J., & Karst, S. M. (2015). Human norovirus culture in B cells. *Nature Protocols*, 10(12), 1939–1947. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.121>
- Jonesteller, C. L., Burnett, E., Yen, C., Tate, J. E., & Parashar, U. D. (2017). Effectiveness of rotavirus vaccination: A systematic review of the first decade of global postlicensure data, 2006–2016. In *Clinical Infectious Diseases* (Vol. 65, Issue 5, pp. 840–850). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/cid/cix369>
- Kambhampati, A., Payne, D. C., Costantini, V., & Lopman, B. A. (2016). Host Genetic Susceptibility to Enteric Viruses: A Systematic Review and Metaanalysis. *Clinical Infectious Diseases*, 62(1), 11–18. <https://doi.org/10.1093/cid/civ873>
- Kanai, Y., Komoto, S., Kawagishi, T., Nouda, R., Nagasawa, N., Onishi, M., Matsuura, Y., Taniguchi, K., & Kobayashi, T. (2017). Entirely plasmid-based reverse genetics system for rotaviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618424114>
- Kane, M., Case, L. K., Kopaskie, K., Kozlova, A., MacDermid, C., Chervonsky, A. V., & Golovkina, T. V. (2011). Successful transmission of a retrovirus depends on the commensal microbiota. *Science*, 334(6053), 245–249. <https://doi.org/10.1126/science.1210718>
- Kapikian, A. Z. (2000). The Discovery of the 27-nm Norwalk Virus: An Historic Perspective. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(s2), S295–S302. <https://doi.org/10.1086/315584>
- Karst, S. M., & Wobus, C. E. (2015). A Working Model of How Noroviruses Infect the Intestine. *PLoS Pathogens*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004626>
- Karst, S. M., Wobus, C. E., Lay, M., Davidson, J., & Virgin IV, H. W. (2003). STAT1-dependent innate immunity to a norwalk-like virus. *Science*, 299(5612), 1575–1578. <https://doi.org/10.1126/science.1077905>
- Katayama, K., Hansman, G. S., Oka, T., Ogawa, S., & Takeda, N. (2006). Investigation of norovirus replication in a human cell line. *Archives of Virology*, 151(7), 1291–1308. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0720-9>
- Kazi, A. M., Cortese, M. M., Yu, Y., Lopman, B., Morrow, A. L., Fleming, J. A., McNeal, M. M., Steele, A. D., Parashar, U. D., Zaidi, A. K. M., & Ali, A. (2017). Secretor and salivary ABO blood group antigen status predict rotavirus vaccine take in infants. *Journal of Infectious Diseases*, 215(5), 786–789. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix028>
- Kirk, M. D., Pires, S. M., Black, R. E., Caipo, M., Crump, J. A., Devleeschauwer, B., Döpfer, D., Fazil, A., Fischer-Walker, C. L., Hald, T., Hall, A. J., Keddy, K. H., Lake, R. J., Lanata, C. F., Torgerson, P. R., Havelaar, A. H., & Angulo, F. J. (2015). World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLoS Medicine*, 12(12), e1001921. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001921>
- Kitaoka, M. (2012). Bifidobacterial Enzymes Involved in the Metabolism of Human Milk Oligosaccharides. *Advances in Nutrition*, 3(3), 422S–429S. <https://doi.org/10.3945/an.111.001420>
- Kobayashi, S., Sakae, K., Suzuki, Y., Shinozaki, K., Okada, M., Ishiko, H., Kamata, K., Suzuki, K., Natori, K., Miyamura, T., & Takeda, N. (2000). Molecular Cloning, Expression, and Antigenicity of Seto Virus Belonging to Genogroup I Norwalk-Like Viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9), 3492–3494. <https://jcm.asm.org/content/38/9/3492.long>
- Komoto, S., Kugita, M., Sasaki, J., & Taniguchi, K. (2008). Generation of Recombinant Rotavirus with an Antigenic Mosaic of Cross-Reactive Neutralization Epitopes on VP4. *Journal of Virology*, 82(13), 6753–6757. <https://doi.org/10.1128/jvi.00601-08>
- Komoto, S., Sasaki, J., & Taniguchi, K. (2006). Reverse genetics system for introduction of site-specific mutations into the double-stranded RNA genome of infectious rotavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(12), 4646–4651. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509385103>
- Koopmans, M., Vinjé, J., Duizer, E., De Wit, M., & Van Duynhoven, Y. (2001). Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. *Novartis Foundation Symposium*, 238(s2), 197–218.

<https://doi.org/10.1086/315573>

- Krissinel, E., & Henrick, K. (2004). Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(12 I), 2256–2268. <https://doi.org/10.1107/S0907444904026460>
- Kroneman, A., Vennema, H., Deforche, K., Avoort, H. v. d., Peñaranda, S., Oberste, M. S., Vinjé, J., & Koopmans, M. (2011). An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *Journal of Clinical Virology*, 51(2), 121–125. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.03.006>
- Kroneman, Annelies, Vega, E., Vennema, H., Vinjé, J., White, P. A., Hansman, G., Green, K., Martella, V., Katayama, K., & Koopmans, M. (2013). Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Archives of Virology*, 158(10), 2059–2068. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1708-5>
- Kuss, S. K., Best, G. T., Etheredge, C. A., Pruijssers, A. J., Frierson, J. M., Hooper, L. V., Dermody, T. S., & Pfeiffer, J. K. (2011). Intestinal microbiota promote enteric virus replication and systemic pathogenesis. *Science*, 334(6053), 249–252. <https://doi.org/10.1126/science.1211057>
- Kuyumcu-Martinez, M., Belliot, G., Sosnovtsev, S. V., Chang, K.-O., Green, K. Y., & Lloyd, R. E. (2004). Calicivirus 3C-Like Proteinase Inhibits Cellular Translation by Cleavage of Poly(A)-Binding Protein. *Journal of Virology*, 78(15), 8172–8182. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.15.8172-8182.2004>
- Labbé, M., Charpilienne, A., Crawford, S. E., Estes, M. K., & Cohen, J. (1991). Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles. *Journal of Virology*, 65(6), 2946–2952. <https://doi.org/10.1128/jvi.65.6.2946-2952.1991>
- Lambden, P. R., Caul, E. O., Ashley, C. R., Clarke, I. N., Rossmann, M. G., & Estes, M. K. (1993). Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science*, 259(5094), 516–519. <https://doi.org/10.1126/science.8380940>
- Larsson, M. M., Rydell, G. E. P., Grahn, A., Rodríguez-Díaz, J., Åkerlind, B., Hutson, A. M., Estes, M. K., Larson, G., & Svensson, L. (2006). Antibody Prevalence and Titer to Norovirus (Genogroup II) Correlate with Secretor (FUT2) but Not with ABO Phenotype or Lewis (FUT3) Genotype. *The Journal of Infectious Diseases*, 194(10), 1422–1427. <https://doi.org/10.1086/508430>
- Lauricica, D. R., Triantis, V., Schoemaker, R., Estes, M. K., & Ramani, S. (2017). Milk Oligosaccharides Inhibit Human Rotavirus Infectivity in MA104 Cells. *The Journal of Nutrition*, jn246090. <https://doi.org/10.3945/jn.116.246090>
- Lawton, J. A., Estes, M. K., & Prasad, B. V. V. (1997). Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nature Structural Biology*, 4(2), 118–121. <https://doi.org/10.1038/nsb0297-118>
- Leen, E. N., Kwok, K. Y. R., Birtley, J. R., Simpson, P. J., Subba-Reddy, C. V., Chaudhry, Y., Sosnovtsev, S. V., Green, K. Y., Prater, S. N., Tong, M., Young, J. C., Chung, L. M. W., Marchant, J., Roberts, L. O., Kao, C. C., Matthews, S., Goodfellow, I. G., & Curry, S. (2013). Structures of the Compact Helical Core Domains of Feline Calicivirus and Murine Norovirus VPg Proteins. *Journal of Virology*, 87(10), 5318–5330. <https://doi.org/10.1128/jvi.03151-12>
- Lei, S., Samuel, H., Twitchell, E., Bui, T., Ramesh, A., Wen, K., Weiss, M., Li, G., Yang, X., Jiang, X., & Yuan, L. (2016a). *Enterobacter cloacae* inhibits human norovirus infectivity in gnotobiotic pigs. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep25017>
- Lei, S., Samuel, H., Twitchell, E., Bui, T., Ramesh, A., Wen, K., Weiss, M., Li, G., Yang, X., Jiang, X., & Yuan, L. (2016b). *Enterobacter cloacae* inhibits human norovirus infectivity in gnotobiotic pigs. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep25017>
- Lindesmith, L. C. (2003). Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm860>
- Lindesmith, L. C., Donaldson, E. F., & Baric, R. S. (2011). Norovirus GII.4 Strain Antigenic Variation. *Journal of Virology*, 85(1), 231–242. <https://doi.org/10.1128/jvi.01364-10>
- Lindesmith, L. C., Donaldson, E. F., Lobue, A. D., Cannon, J. L., Zheng, D.-P., Vinje, J., & Baric, R. S. (2008). *Mechanisms of GII.4 Norovirus Persistence in Human Populations*. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050031>
- Liu, B., Clarke, I. N., & Lambden, P. R. (1996). Polyprotein processing in Southampton virus: identification of 3C-like protease cleavage sites by in vitro mutagenesis. *Journal of Virology*, 70(4), 2605–2610. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.4.2605-2610.1996>
- Liu, B. L., Lambden, P. R., Günther, 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(1), 819–825. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9847396>
- Liu, M., Mattion, N. M., & Estes, M. K. (1992). Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology*, 188(1), 77–84. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90736-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90736-9)
- Liu, Y. Y., Huang, P., Tan, M., Biesiada, J., Meller, J., Castello, A. A., Jiang, B., & Jiang, X. (2012). Rotavirus VP8\*: phylogeny, host range, and interaction with histo-blood group antigens. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/JVI.00979-12>

- Liu, Y., Zhang, Z., Chen, Y., Li, X., Zhang, X. C., Lou, Z., Jiang, X., Rao, Z., Cao, S., & Tan, M. (2007). Structural Basis for the Recognition of Blood Group Trisaccharides by Norovirus. *Journal of Virology*, *81*(11), 5949–5957. <https://doi.org/10.1128/jvi.00219-07>
- Liu, Yang, Jiang, X., Huang, P., Jiang, B., Tan, M., & Morrow, A. L. (2013). Poly-LacNAc as an Age-Specific Ligand for Rotavirus P[11] in Neonates and Infants. *PLoS ONE*, *8*(11), e78113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078113>
- Liu, Yang, Ramelot, T. A., Huang, P., Liu, Y., Li, Z., Feizi, T., Zhong, W., Wu, F.-T., Tan, M., Kennedy, M. A., & Jiang, X. (2016). Glycan Specificity of P[19] Rotavirus and Comparison with Those of Related P Genotypes. *Journal of Virology*, *90*(21), 9983–9996. <https://doi.org/10.1128/jvi.01494-16>
- Liu, Yang, Xu, S., Woodruff, A. L., Xia, M., Tan, M., Kennedy, M. A., & Jiang, X. (2017). Structural basis of glycan specificity of P[19] VP8\*: Implications for rotavirus zoonosis and evolution. *PLoS Pathogens*, *13*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006707>
- López, S., & Arias, C. F. (2004). Multistep entry of rotavirus into cells: A Versaillesque dance. In *Trends in Microbiology* (Vol. 12, Issue 6, pp. 271–278). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.04.003>
- 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*, *3*(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-3-13>
- Love, D. N., & Sabine, M. (1975). Electron microscopic observation of feline kidney cells infected with a feline calicivirus. *Archives of Virology*, *48*(3), 213–228. <https://doi.org/10.1007/BF01317964>
- Luttermann, C., & Meyers, G. (2009). The importance of inter- and intramolecular base pairing for translation reinitiation on a eukaryotic bicistronic mRNA. *Genes and Development*, *23*(3), 331–334. <https://doi.org/10.1101/gad.507609>
- Madeley, C. R. (1979). Comparison of the Features of Astroviruses and Caliciviruses Seen in Samples of Feces by Electron Microscopy. *Journal of Infectious Diseases*, *139*(5), 519–523. <https://doi.org/10.1093/infdis/139.5.519>
- Madore, H. P., Treanor, J. J., & Dolin, R. (1986). Characterization of the Snow Mountain agent of viral gastroenteritis. *Journal of Virology*, *58*(2), 487–492. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3009862>
- Maguire, A. J., Green, J., Brown, D. W. G., Desselberger, U., & Gray, J. J. (1999). Molecular Epidemiology of Outbreaks of Gastroenteritis Associated with Small Round-Structured Viruses in East Anglia, United Kingdom, During the 1996–1997 Season. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(1), 81–89. <https://jcm.asm.org/content/37/1/81.long>
- Marionneau, Séverine, Airaud, F., Bovin, N. V., Pendu, J. L., & Ruvoën-Clouet, N. (2005). Influence of the Combined ABO, FUT2, and FUT3 Polymorphism on Susceptibility to Norwalk Virus Attachment. *The Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1086/432546>
- Marionneau, Séverine, Cailleau-Thomas, A., Rocher, J., Le Moullac-Vaidye, B., Ruvoën, N., Clément, M., & Le Pendu, J. (2001). ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. In *Biochimie* (Vol. 83, Issue 7, pp. 565–573). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(01\)01321-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(01)01321-9)
- Marionneau, Severine, Ruvoën, N., Le MoullacVaidye, B., Clement, M., CailleauThomas, A., RuizPalacois, G., Huang, P., Jiang, X., & Le Pendu, J. (2002). Norwalk Virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.33661>
- Mathieu, M., Petitpas, I., Navaza, J., Lepault, J., Kohli, E., Pothier, P., Prasad, B. V. V., Cohen, J., & Rey, F. A. (2001). Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: Implications for the architecture of the virion. *EMBO Journal*, *20*(7), 1485–1497. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.7.1485>
- Matsui, S. M., & Greenberg, H. B. (2000). Immunity to Calicivirus Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, *181*(s2), S331–S335. <https://doi.org/10.1086/315587>
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S. M., Attoui, H., Bányai, K., Brister, J. R., Buesa, J., Esona, M. D., Estes, M. K., Gentsch, J. R., Iturriza-Gómara, M., Johne, R., Kirkwood, C. D., Martella, V., Mertens, P. P. C., Nakagomi, O., Parreño, V., Rahman, M., Ruggeri, F. M., ... van Ranst, M. (2011). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Archives of Virology*. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1006-z>
- Matthijnssens, J., Otto, P. H., Ciarlet, M., Desselberger, U., van Ranst, M., & Johne, R. (2012). VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Archives of Virology*. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1273-3>
- Matthijnssens, J., Rahman, M., & van Ranst, M. (2008). Two out of the 11 genes of an unusual human G6P[6] rotavirus isolate are of bovine origin. *Journal of General Virology*, *89*(10), 2630–2635. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/003780-0>
- Mayrose, I., Penn, O., Erez, E., Rubinstein, N. D., Shlomi, T., Freund, N. T., Bublil, E. M., Ruppín, E., Sharan, R., Gershoni, J. M., Martz, E., & Pupko, T. (2007). Pepitope: Epitope mapping from affinity-selected peptides. *Bioinformatics*, *23*(23), 3244–3246. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm493>

- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., & Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*, 40(4), 658–674. <https://doi.org/10.1107/S0021889807021206>
- McFadden, N., Bailey, D., Carrara, G., Benson, A., Chaudhry, Y., Shortland, A., Heeney, J., Yarovinsky, F., Simmonds, P., Macdonald, A., & Goodfellow, I. (2011). Norovirus regulation of the innate immune response and apoptosis occurs via the product of the alternative open reading frame 4. *PLoS Pathogens*, 7(12), e1002413. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002413>
- McNulty, M. S., Curran, W. L., Todd, D., & McFerran, J. B. (1979). Detection of Viruses in Avian Faeces By Direct Electron Microscopy. *Avian Pathology*. <https://doi.org/10.1080/03079457908418349>
- Mikami, T., Nakagomi, T., Tsutsui, R., Ishikawa, K., Onodera, Y., Arisawa, K., & Nakagomi, O. (2004). An outbreak of gastroenteritis during school trip caused by serotype G2 group A rotavirus. *Journal of Medical Virology*, 73(3), 460–464. <https://doi.org/10.1002/jmv.20112>
- Miura, T., Sano, D., Suenaga, A., Yoshimura, T., Fuzawa, M., Nakagomi, T., Nakagomi, O., & Okabe, S. (2013). Histo-Blood Group Antigen-Like Substances of Human Enteric Bacteria as Specific Adsorbents for Human Noroviruses. *Journal of Virology*, 87(17), 9441–9451. <https://doi.org/10.1128/jvi.01060-13>
- Monedero, V., Buesa, J., & Rodríguez-Díaz, J. (2018). The interactions between host glycobiology, bacterial microbiota, and viruses in the gut. In *Viruses* (Vol. 10, Issue 2). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/v10020096>
- Mossel, E. C., & Ramig, R. F. (2003). A Lymphatic Mechanism of Rotavirus Extraintestinal Spread in the Neonatal Mouse. *Journal of Virology*, 77(22), 12352–12356. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.22.12352-12356.2003>
- Murakami, K., Kurihara, C., Oka, T., Shimoike, T., Fujii, Y., Takai-Todaka, R., Park, Y. Bin, Wakita, T., Matsuda, T., Hokari, R., Miura, S., & Katayama, K. (2013). Norovirus Binding to Intestinal Epithelial Cells Is Independent of Histo-Blood Group Antigens. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066534>
- Navarro, A., Trask, S. D., & Patton, J. T. (2013). Generation of Genetically Stable Recombinant Rotaviruses Containing Novel Genome Rearrangements and Heterologous Sequences by Reverse Genetics. *Journal of Virology*, 87(11), 6211–6220. <https://doi.org/10.1128/jvi.00413-13>
- Neill, J. D. (1990). Nucleotide sequence of a region of the feline calicivirus genome which encodes picornavirus-like RNA-dependent RNA polymerase, cysteine protease and 2C polypeptides. *Virus Research*, 17(3), 145–160. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(90\)90061-F](https://doi.org/10.1016/0168-1702(90)90061-F)
- Nilsson, M., Hedlund, K.-O., Thorhagen, M., Larson, G., Johansen, K., Ekspong, A., & Svensson, L. (2003). Evolution of Human Calicivirus RNA In Vivo: Accumulation of Mutations in the Protruding P2 Domain of the Capsid Leads to Structural Changes and Possibly a New Phenotype. *Journal of Virology*, 77(24), 13117–13124. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.24.13117-13124.2003>
- Nishikawa, K., Fukuhara, N., Liprandi, F., Green, K., Kapikian, A. Z., Chanock, R. M., & Gorziglia, M. (1989). VP4 protein of porcine rotavirus strain OSU expressed by a baculovirus recombinant induces neutralizing antibodies. *Virology*, 173(2), 631–637. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90575-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90575-8)
- Nordgren, J., Sharma, S., Bucardo, F., Nasir, W., Günaydin, G., Ouermi, D., Nitiema, L. W., Becker-Dreps, S., Simpre, J., Hammarström, L., Larson, G., & Svensson, L. (2014). Both lewis and secretor status mediate susceptibility to rotavirus infections in a rotavirus genotype-dependent manner. *Clinical Infectious Diseases*, 59(11), 1567–1573. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu633>
- Oberste, M. S., Maher, K., Kilpatrick, D. R., & Pallansch, M. A. (1999). Molecular Evolution of the Human Enteroviruses: Correlation of Serotype with VP1 Sequence and Application to Picornavirus Classification. *Journal of Virology*, 73(3), 1941–1948. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.3.1941-1948.1999>
- Oliver, S. L., Dastjerdi, A. M., Wong, S., El-Attar, L., Gallimore, C., Brown, D. W. G., 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. *Journal of Virology*, 77(4), 2789–2798. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.4.2789-2798.2003>
- Parashar, U. D., Alexander, J. P., Glass, R. I., Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), C. for D. C., & (CDC), P. (2006). Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*.
- Parashar, U. D., Alexander, J. P., Glass, R. I., Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), C. for D. C., (CDC), P., Cortese, M. M., Parashar, U. D., Alexander, J. P., Glass, R. I., Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), C. for D. C., (CDC), P., Cortese, M. M., Parashar, U. D., Alexander, J. P., Glass, R. I., Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), C. for D. C., & (CDC), P. (2006). Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR: Recommendations and Reports*. <https://doi.org/rr5802a1> [pii]
- Parra, G. I., Abente, E. J., Sandoval-Jaime, C., Sosnovtsev, S. V., Bok, K., & Green, K. Y. (2012). Multiple Antigenic Sites Are Involved in Blocking the Interaction of GII.4 Norovirus Capsid with ABH Histo-Blood Group Antigens.

<https://doi.org/10.1128/JVI.06729-11>

- Patel, M. M., Hall, A. J., Vinjé, J., & Parashar, U. D. (2009). Noroviruses: A comprehensive review. In *Journal of Clinical Virology* (Vol. 44, Issue 1, pp. 1–8). <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.10.009>
- Patton, J. T., & Gallegos, C. O. (1990). Rotavirus RNA replication: single-stranded RNA extends from the replicase particle. *Journal of General Virology*, 71(5), 1087–1094. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-5-1087>
- Patton, John T., Kearney, K., & Taraporewala, Z. (2003). II, 4. Rotavirus genome replication: Role of the RNA-binding proteins. *Perspectives in Medical Virology*, 9, 165–183. [https://doi.org/10.1016/s0168-7069\(03\)09011-6](https://doi.org/10.1016/s0168-7069(03)09011-6)
- Payne, D. C., Currier, R. L., Staat, M. A., Sahni, L. C., Selvarangan, R., Halasa, N. B., Englund, J. A., Weinberg, G. A., Boom, J. A., Szilagyi, P. G., Klein, E. J., Chappell, J., Harrison, C. J., Davidson, B. S., Mijatovic-Rustempasic, S., Moffatt, M. D., McNeal, M., Wikswo, M., Bowen, M. D., ... Parashar, U. D. (2015). Epidemiologic Association Between *FUT2* Secretor Status and Severe Rotavirus Gastroenteritis in Children in the United States. *JAMA Pediatrics*, 169(11), 1040. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2015.2002>
- Pérez-Ortín, R., Vila-Vicent, S., Carmona-Vicente, N., Santiso-Bellón, C., Rodríguez-Díaz, J., & Buesa, J. (2019). Histo-Blood Group Antigens in Children with Symptomatic Rotavirus Infection. *Viruses*. <https://doi.org/10.3390/v11040339>
- Pesavento, J. B., Billingsley, A. M., Roberts, E. J., Ramig, R. F., & Prasad, B. V. V. (2003). Structures of Rotavirus Reassortants Demonstrate Correlation of Altered Conformation of the VP4 Spike and Expression of Unexpected VP4-Associated Phenotypes. *Journal of Virology*, 77(5), 3291–3296. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.5.3291-3296.2003>
- Pesavento, J. B., Lawton, J. A., Estes, M. K., & Prasad, B. V. V. (2001). The reversible condensation and expansion of the rotavirus genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), 1381–1386. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1381>
- Pfister, T., & Wimmer, E. (2001). Polypeptide p41 of a Norwalk-Like Virus Is a Nucleic Acid-Independent Nucleoside Triphosphatase. *Journal of Virology*, 75(4), 1611–1619. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.4.1611-1619.2001>
- Piron, M., Vende, P., Cohen, J., & Poncet, D. (1998). Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO Journal*, 17(19), 5811–5821. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5811>
- Poncet, D., Laurent, S., & Cohen, J. (1994). Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *The EMBO Journal*, 13(17), 4165–4173. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06734.x>
- Prasad, B. V.V., Hardy, M. E., Jiang, X., & Estes, M. K. (1996). Structure of Norwalk virus. *Archives of Virology, Supplement*, 1996(12), 237–242. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6553-9\\_25](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6553-9_25)
- Prasad, B. V.Venkataram, 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(5438), 287–290. <https://doi.org/10.1126/science.286.5438.287>
- Prasad, B. V, Rothnagel, R., Jiang, X., & Estes, M. K. (1994). Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *Journal of Virology*, 68(8), 5117–5125. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8035511>
- Ramani, S., Cortes-Penfield, N. W., Hu, L., Crawford, S. E., Czako, R., Smith, D. F., Kang, G., Ramig, R. F., Le Pendu, J., Prasad, B. V. V., Estes, M. K., Le Pendu, J., Kang, G., Hu, L., Estes, M. K., Smith, D. F., Czako, R., Crawford, S. E., Cortes-Penfield, N. W., ... Ramani, S. (2013). The VP8\* Domain of Neonatal Rotavirus Strain G10P[11] Binds to Type II Precursor Glycans. *Journal of Virology*, 87(13), 7255–7264. <https://doi.org/10.1128/jvi.03518-12>
- Ramani, S., Hu, L., Venkataram Prasad, B. V., & Estes, M. K. (2016). Diversity in Rotavirus-Host Glycan Interactions: A “Sweet” Spectrum. *Cmgh*, 2(3), 263–273. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.03.002>
- Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S., & Ouwehand, A. C. (2003). Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: A risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization? *Veterinary Microbiology*, 92(1–2), 111–119. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00356-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00356-5)
- Rodríguez-Díaz, J., García-Mantrana, I., Vila-Vicent, S., Gozalbo-Rovira, R., Buesa, J., Monedero, V., & Collado, M. C. M. C. (2017). Relevance of secretor status genotype and microbiota composition in susceptibility to rotavirus and norovirus infections in humans. *Scientific Reports*, 7(1), 45559. <https://doi.org/10.1038/srep45559>
- Rodríguez-Díaz, J., Rubilar-Abreu, E., Spitzner, M., Hedlund, K. O., Liprandi, F., & Svensson, L. (2008). Design of a multiplex nested PCR for genotyping of the NSP4 from group A rotavirus. *Journal of Virological Methods*, 149(2), 240–245. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.01.030>
- Rodríguez, J. M., Chichón, F. J., Martín-Forero, E., González-Camacho, F., Carrascosa, J. L., Castón, J. R., & Luque, D. (2014). New Insights into Rotavirus Entry Machinery: Stabilization of Rotavirus Spike Conformation Is Independent of Trypsin Cleavage. *PLoS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004157>
- Rodríguez, J. M., & Luque, D. (2019). Structural Insights into Rotavirus Entry. In *Advances in Experimental Medicine and*

- Rohayem, J., Jäger, K., Robel, I., Scheffler, U., Temme, A., & Rudolph, W. (2006). Characterization of norovirus 3Dpol RNA-dependent RNA polymerase activity and initiation of RNA synthesis. *Journal of General Virology*, *87*(9), 2621–2630. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81802-0>
- Rossmann, M. G., & Johnson, J. E. (1989). Icosahedral RNA Virus Structure. *Annual Review of Biochemistry*, *58*(1), 533–569. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.58.070189.002533>
- Rubio-del-Campo, A., Coll-Marqués, J. M., Yebra, M. J., Buesa, J., Pérez-Martínez, G., Monedero, V., & Rodríguez-Díaz, J. (2014). Noroviral P-particles as an in vitro model to assess the interactions of noroviruses with probiotics. *PLoS ONE*, *9*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089586>
- Ruggeri, F. M., & Greenberg, H. B. (1991). Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *Journal of Virology*, *65*(5), 2211–2219. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1850007>
- Ruvoën-Clouet, N., Ganière, J. P., André-Fontaine, G., Blanchard, D., & Le Pendu, J. (2000). Binding of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus to Antigens of the ABH Histo-Blood Group Family. *Journal of Virology*, *74*(24), 11950–11954. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.24.11950-11954.2000>
- Sadiq, A., Bostan, N., Yinda, K. C., Naseem, S., & Sattar, S. (2018). Rotavirus: Genetics, pathogenesis and vaccine advances. In *Reviews in Medical Virology* (Vol. 28, Issue 6, p. e2003). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/rmv.2003>
- Sali, A., & Blundell, T. (1994). Comparative modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* *234*, 779–815. In *Journal of molecular biology* (Vol. 234, pp. 779–815). <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1626>
- Salim, O., Clarke, I. N., & Lambden, P. R. (2008). Functional analysis of the 5' genomic sequence of a bovine norovirus. *PLoS ONE*, *3*(5), e2169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002169>
- Santos, M. L., Florentino, A. O., Saeki, M. J., Aparecida, A. H., Lia Fook, M. V., & Guastaldi, A. C. (2005). Síntese de hidroxapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: Nitrato de cálcio e ácido fosfórico. *Eclética Quimica*, *30*(3), 29–35. <https://doi.org/10.1002/rmv.448>
- Seah, E. L., Marshall, J. A., & Wright, P. J. (2003). Trans activity of the norovirus Camberwell proteinase and cleavage of the N-terminal protein encoded by ORF1. *Journal of Virology*, *77*(12), 7150–7155. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.12.7150-7155.2003>
- Servin, A. (2003). *Effects of rotavirus infection on the structure and functions of intestinal cells* (U Desselberger & J. Gray (eds.); Viral gast). Elsevier.
- Siebenga, J. J., Vennema, H., Renckens, B., de Bruin, E., van der Veer, B., Siezen, R. J., & Koopmans, M. (2007). Epochal Evolution of GGII.4 Norovirus Capsid Proteins from 1995 to 2006. *Journal of Virology*, *81*(18), 9932–9941. <https://doi.org/10.1128/jvi.00674-07>
- Smiley, J. R., Hoet, A. E., Trávén, M., Tsunemitsu, H., & Saif, L. J. (2003). Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(7), 3089–3099. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.3089-3099.2003>
- Smith, A. W., Akers, T. G., Madin, S. H., & Vedros, N. A. (1973). San Miguel sea lion virus isolation, preliminary characterization and relationship to vesicular exanthema of swine virus. *Nature*, *244*(5411), 108–110. <https://doi.org/10.1038/244108a0>
- Smith, A. W., Skilling, D. E., Ensley, P. K., Benirschke, K., & Lester, T. L. (1983). Calicivirus isolation and persistence in a pygmy chimpanzee (*Pan paniscus*). *Science*, *221*(4605), 79–81. <https://doi.org/10.1126/science.6304880>
- Sosnovtsev, S. V., Prikhod'ko, E. A., Belliot, G., Cohen, J. I., & Green, K. Y. (2003). Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells. *Virus Research*, *94*(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(03\)00115-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(03)00115-1)
- Sugieda, M., & Nakajima, S. (2002). Viruses detected in the caecum contents of healthy pigs representing a new genetic cluster in genogroup II of the genus “Norwalk-like viruses.” *Virus Research*, *87*(2), 165–172. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(02\)00107-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00107-7)
- Sun, X., Dang, • Lei, Li, D., Qi, J., Wang, • Mengxuan, Chai, W., Zhang, Q., Wang, H., Bai, R., Tan, M., & Duan, Z. (2019). Structural Basis of Glycan Recognition in Globally Predominant Human P[8] Rotavirus. *Virologica Sinica*. <https://doi.org/10.1007/s12250-019-00164-7>
- Sun, X., Guo, N., Li, D., Jin, M., Zhou, Y., Xie, G., Pang, L., Zhang, Q., Cao, Y., & Duan, Z. J. (2016). Binding specificity of P[8] VP8\* proteins of rotavirus vaccine strains with histo-blood group antigens. *Virology*, *495*, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.05.010>
- Sun, X., Li, D., Qi, J., Chai, W., Wang, L., Wang, L., Peng, R., Wang, H., Zhang, Q., Pang, L., Kong, X., Wang, H., Jin, M., Gao, G. F., & Duan, Z. (2018). Glycan Binding Specificity and Mechanism of Human and Porcine P[6]/P[19] Rotavirus VP8\*s. *Journal of Virology*, *92*(14). <https://doi.org/10.1128/jvi.00538-18>

- Svensson, L., Sheshberadaran, H., Vene, S., Norrby, E., Grandien, M., & Wadell, G. (1987). Serum antibody responses to individual viral polypeptides in human rotavirus infections. *Journal of General Virology*, 68(3), 643–651. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-3-643>
- Tan, M., R. H., & Jiang, X. (2003). The P Domain of Norovirus Capsid Protein Forms Dimer and Binds to Histo-Blood Group Antigen Receptors. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.12.6233>
- Tan, Ming, Hegde, R. S., & Jiang, X. (2004). The P Domain of Norovirus Capsid Protein Forms Dimer and Binds to Histo-Blood Group Antigen Receptors. *Journal of Virology*, 78(12), 6233–6242. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.12.6233-6242.2004>
- Tan, Ming, & Jiang, X. (2005). The P Domain of Norovirus Capsid Protein Forms a Subviral Particle That Binds to Histo-Blood Group Antigen Receptors. *Journal of Virology*, 79(22), 14017–14030. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.22.14017-14030.2005>
- Tan, Ming, & Jiang, X. (2010). Norovirus Gastroenteritis, Carbohydrate Receptors, and Animal Models. *PLoS Pathogens*, 6(8), e1000983. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000983>
- Tan, Ming, & Jiang, X. (2011). Norovirus-host interaction: Multi-selections by human histo-blood group antigens. *Trends in Microbiology*, 19(8), 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.05.007>
- Tan, Ming, Xia, M., Chen, Y., Bu, W., Hedge, R. S., Meller, J., Li, X., & Jiang, X. (2009). Conservation of carbohydrate binding interfaces - Evidence of human HBGA selection in norovirus evolution. *PLoS ONE*, 4(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005058>
- Tate, J. E., Burton, A. H., Boschi-Pinto, C., Parashar, U. D., Agocs, M., Serhan, F., De Oliveira, L., Mwenda, J. M., Mihigo, R., Ranjan Wijesinghe, P., Abeysinghe, N., Fox, K., & Paladin, F. (2016). Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000-2013. *Clinical Infectious Diseases*, 62, S96–S105. <https://doi.org/10.1093/cid/civ1013>
- Taube, S., Kolawole, A. O., Höhne, M., Wilkinson, J. E., Handley, S. A., Perry, J. W., Thackray, L. B., Akkina, R., & Wobus, C. E. (2013). A mouse model for human norovirus. *MBio*, 4(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00450-13>
- Trask, S. D., Taraporewala, Z. F., Boehme, K. W., Dermody, T. S., & Patton, J. T. (2010). Dual selection mechanisms drive efficient single-gene reverse genetics for rotavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(43), 18652–18657. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011948107>
- Troeger, C., Khalil, I. A., Rao, P. C., Cao, S., Blacker, B. F., Ahmed, T., Armah, G., Bines, J. E., Brewer, T. G., Colombara, D. V., Kang, G., Kirkpatrick, B. D., Kirkwood, C. D., Mwenda, J. M., Parashar, U. D., Petri, W. A., Riddle, M. S., Steele, A. D., Thompson, R. L., ... Reiner, R. C. (2018). Rotavirus Vaccination and the Global Burden of Rotavirus Diarrhea among Children Younger Than 5 Years. *JAMA Pediatrics*, 172(10), 958–965. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2018.1960>
- Vagin, A. A., Steiner, R. A., Lebedev, A. A., Potterton, L., McNicholas, S., Long, F., & Murshudov, G. N. (2004). REFMAC5 dictionary: Organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(12 I), 2184–2195. <https://doi.org/10.1107/S0907444904023510>
- van Beek, J., Ambert-Balay, K., Botteldoorn, N., Eden, J. S., Fonager, J., Hewitt, J., Iritani, N., Kroneman, A., Vennema, H., Vinjé, J., White, P. A., & Koopmans, M. (2013). Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of Genotype II.4, LATE 2012. *Eurosurveillance*, 18(1), 20345. <https://doi.org/10.2807/ese.18.01.20345-en>
- Van Der Poel, W. H. M., Vinjé, J., Van Der Heide, R., Herrera, M. I., Vivo, A., & Koopmans, M. P. G. (2000). Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerging Infectious Diseases*, 6(1), 36–41. <https://doi.org/10.3201/eid0601.000106>
- Vinjé, J., Estes, M. K., Esteves, P., Green, K. Y., Katayama, K., Knowles, N. J., L'Homme, Y., Martella, V., Vennema, H., & White, P. A. (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Caliciviridae. *Journal of General Virology*, 100(11), 1469–1470. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001332>
- Vinjé, J., Hamidjaja, R. A., & Sobsey, M. D. (2004). Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *Journal of Virological Methods*, 116(2), 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.11.001>
- Vongpunsawad, S., Venkataram Prasad, B. V., & Estes, M. K. (2013). Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain. *Journal of Virology*, 87(9), 4818–4825. <https://doi.org/10.1128/jvi.03508-12>
- Walker, F. C., & Baldrige, M. T. (2019). Interactions between noroviruses, the host, and the microbiota. In *Current Opinion in Virology* (Vol. 37, pp. 1–9). <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.04.001>
- Wang, H., Naghavi, M., Allen, C., Barber, R. M., Carter, A., Casey, D. C., Charlson, F. J., Chen, A. Z., Coates, M. M., Coggeshall, M., Dandona, L., Dicker, D. J., Erskine, H. E., Haagsma, J. A., Fitzmaurice, C., Foreman, K., Forouzanfar, M. H., Fraser, M. S., Fullman, N., ... Zuhlke, L. J. (2016). Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, 388(10053), 1459–1544. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31012-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31012-1)

- Wang, J., Jiang, X., Madore, H. P., Gray, J., Desselberger, U., Ando, T., Seto, Y., Oishi, I., Lew, J. F., & Green, K. Y. (1994). Sequence diversity of small, round-structured viruses in the Norwalk virus group. *Journal of Virology*, *68*(9), 5982–5990. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8057474>
- Wei, C., Farkas, T., Sestak, K., & Jiang, X. (2008). Recovery of Infectious Virus by Transfection of In Vitro-Generated RNA from Tulane Calicivirus cDNA. *Journal of Virology*, *82*(22), 11429–11436. <https://doi.org/10.1128/jvi.00696-08>
- White, L. J., Hardy, M. E., & Estes, M. K. (1997). Biochemical characterization of a smaller form of recombinant Norwalk virus capsids assembled in insect cells. *Journal of Virology*, *71*(10), 8066–8072. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.10.8066-8072.1997>
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G. W., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A., & Wilson, K. S. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. In *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* (Vol. 67, Issue 4, pp. 235–242). <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>
- 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 IV, H. W. (2004). Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020432>
- Yang, Y., Xia, M., Tan, M., Huang, P., Zhong, W., Pang, X. L., Lee, B. E., Meller, J., Wang, T., & Jiang, X. (2010). Genetic and Phenotypic Characterization of GII-4 Noroviruses That Circulated during 1987 to 2008 † Downloaded from. *JOURNAL OF VIROLOGY*, *84*(18), 9595–9607. <https://doi.org/10.1128/JVI.02614-09>
- Yeager, M., Dryden, K. A., Olson, N. H., Greenberg, H. B., & Baker, T. S. (1990). Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *Journal of Cell Biology*, *110*(6), 2133–2144. <https://doi.org/10.1083/jcb.110.6.2133>
- Yu, Y., Lasanajak, Y., Song, X., Hu, L., Ramani, S., Mickum, M. L., Ashline, D. J., Prasad, B. V. V., Estes, M. K., Reinhold, V. N., Cummings, R. D., & Smith, D. F. (2014). Human milk contains novel glycans that are potential decoy receptors for neonatal rotaviruses. *Molecular and Cellular Proteomics*, *13*(11), 2944–2960. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.039875>
- Yunus, M. A., Chung, L. M. W., Chaudhry, Y., Bailey, D., & Goodfellow, I. (2010). Development of an optimized RNA-based murine norovirus reverse genetics system. *Journal of Virological Methods*, *169*(1), 112–118. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2010.07.006>
- Zakikhany, K., Allen, D. J., David, B., & Iturriza-Gómara, M. (2009). Molecular Evolution of GII-4 Norovirus Strains. *PLoS One*, *4*(5), 1–9. <https://doi.org/10.1371/Citation>
- Zeller, M., Donato, C., Trovão, N. S., Cowley, D., Heylen, E., Donker, N. C., McAllen, J. K., Akopov, A., Kirkness, E. F., Lemey, P., Van Ranst, M., Matthijnssens, J., & Kirkwood, C. D. (2015). Genome-Wide Evolutionary Analyses of G1P[8] Strains Isolated Before and After Rotavirus Vaccine Introduction. *Genome Biology and Evolution*, *7*(9), 2473–2483. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv157>
- Zeller, M., Heylen, E., Damanka, S., Pietsch, C., Donato, C., Tamura, T., Kulkarni, R., Arora, R., Cunliffe, N., Maunula, L., Potgieter, C., Tamim, S., De Coster, S., Zhirakovskaya, E., Bdour, S., O'Shea, H., Kirkwood, C. D., Seheri, M., Nyaga, M. M., ... Matthijnssens, J. (2015). Emerging OP354-Like P[8] rotaviruses have rapidly dispersed from Asia to other continents. *Molecular Biology and Evolution*, *32*(8), 2060–2071. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv088>
- 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*(2), 312–323. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.11.015>