

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ÉRIKA DA SILVA CZERNISZ

**Ações de Nef de HIV-1 na maquinaria de tráfego intracelular para neutralizar o
fator de restrição SERINC5**

Ribeirão Preto

2018

ÉRIKA DA SILVA CZERNISZ

Ações de Nef de HIV-1 na maquinaria de tráfego intracelular para neutralizar o fator de restrição SERINC5

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Luis Lamberti P. da Silva

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Czernisz, Érika da Silva

Ações de Nef de HIV-1 na maquinaria de tráfego intracelular para neutralizar o fator de restrição SERINC5. Ribeirão Preto, 2018.

67 p. :il

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: daSilva, Luis Lamberti Pinto.

1.HIV-1. 2.SERINC5. 3.Nef. 4.AP-1.

Nome: CZERNISZ, Érika da Silva

Título: Ações de Nef de HIV-1 na maquinaria de tráfego intracelular para neutralizar o fator de restrição SERINC5

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho a todos os alunos de pós-graduação que lutam ou lutaram para completar suas pesquisas. Principalmente àqueles que enfrentaram algum tipo de dificuldade durante o percurso.

“Um cientista, que também é um ser humano, não deve descansar enquanto o conhecimento que pode reduzir o sofrimento repousa em uma estante.”

Albert Sabin

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Luis Lamberti que me concedeu a oportunidade de fazer parte de sua equipe de pesquisa e conseqüentemente desenvolver a tese de doutorado em seu laboratório. Assim como pela orientação e ensinamentos durante estes anos de minha formação, pela convivência harmoniosa e produtivas discussões científicas. Agradeço ao Prof. Dr. Dario Zamboni, exemplo de cientista jovem e, que muito me incentivou durante a pós-graduação. Agradeço a todos os professores do programa de Biologia Celular e Molecular, em especial à professora Dra. Maria Cristina Barreira, com quem tive o grande prazer de cursar minha primeira disciplina e que me recebeu carinhosamente na pós-graduação. Os três professores citados anteriormente são exemplos de pessoas que realmente colaboram para que o pós-graduando continue com brilho nos olhos, vontade e curiosidade para continuar, independente das dificuldades que encontram no caminho da formação científica. Agradeço à professora Dra. Luciana Jesus da Costa por gentilmente ter me recebido em seu laboratório durante um importante período do desenvolvimento do meu projeto. Período que foi de muito aprendizado.

Agradeço à Andreia N. de Carvalho, técnica do laboratório Tráfego Intracelular de Proteínas, que me ajudou em inúmeros momentos durante o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço à secretária do programa, Gabriela Zamoner, que acompanha e auxilia atenciosamente cada aluno. Agradeço ao suporte técnico e conseqüente amizade que nasceu da rotina e dos trabalhos realizados junto com Roberta Rosales no laboratório multiusuário de Microscopia Multiphoton, Elisabete Milani no laboratório multiusuário de Microscopia Confocal, e Denise Ferraz no Citômetro de Fluxo. Agradeço também à Capes, CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro.

Quanto ao querido grupo de pesquisa do laboratório Tráfego Intracelular de Proteínas, onde tive a oportunidade de me sentir como membro de uma família, e passei a maior parte do meu tempo durante os últimos anos, gostaria de agradecer pelo apoio, amizade, momentos de descontração e por toda ajuda pessoal e profissional. São os incríveis: Andreia, Mara, Yunan, Roberta, Juliane, Cristina, Leonardo, Lucas, Estela, Natália, Letícia, Marlon e Marcos. Em especial agradeço ao Lucas, colaborador em meu projeto de pesquisa desde o início e que se manteve sempre com espírito pró ativo para que o mesmo se desenvolvesse da melhor forma. Agradeço à Cristina Santos, minha grande amiga e exemplo de otimismo e ânimo para desvendar as questões científicas, principalmente àquelas relacionadas ao HIV, e que também me auxiliou em parte deste

estudo. Agradeço à Juliane pela parceria e auxílio em experimentos de laboratório BSL-3. Agradeço à Mara Elisama pela ajuda e companheirismo, melhor companheira de viagens. Agradeço ao Marcos, pessoa querida com quem tive o prazer de trabalhar no final deste projeto. Agradeço à Estela pelos ensinamentos sobre virologia e também pela amizade. Enfim, eu poderia escrever páginas agradecendo e relembrando bons momentos que tive com cada membro deste grande grupo. Eu acredito que uma das coisas mais importantes do meu doutorado, e que me deixou mais feliz e realizada, foi a convivência e o aprendizado junto com essas pessoas.

Mesmo aqueles não envolvidos diretamente neste projeto foram essenciais de alguma forma ou em algum momento, por isso sou muito grata aos meus queridos amigos. Agradeço aos grandes Daniele Albuquerque, Rodrigo Vida e Elisângela Gomes, que sempre foram companheiros e amigos incríveis. Agradeço à Roberta Salomão, Carolina Thomé, Sílvia Helena Bolfarini, Aline Dragalzew e Dilson Rufino, pois como pessoas doces que são podemos viver momentos felizes durante a pós-graduação. Agradeço aos amigos do laboratório de Proteômica do Câncer, Aline, Camila, Mariana e Germano, assim como o Prof. Dr. Vitor Faça pelo apoio e bons momentos de amizade. Agradeço também a todos os meus amigos estudantes do programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, em especial, os do Centro de Pesquisa em Virologia.

E finalmente, o agradecimento mais valioso. Agradeço aos meus pais, Eliane e Devair, e meu irmão, Victor, pelo apoio incondicional, paciência, auxílio, amor e momentos de felicidade. Eles são meu suporte principal e pessoas que sempre acreditaram em mim e me deram força. Essenciais para que eu pudesse concluir minha pós-graduação. Agradeço ao Hugo Duarte pelo amor e companheirismo, também fundamentais para mim.

RESUMO

Czernisz, E. S. **Ações de Nef de HIV-1 na maquinaria de tráfego intracelular para neutralizar o fator de restrição SERINC5**. 2018. 67 p. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Nef é uma proteína acessória codificada pelo HIV-1 que aumenta a infectividade das partículas virais. Nef subverte a maquinaria de tráfego de proteínas para robustamente fazer a regulação negativa de moléculas da superfície celular (incluindo CD4 e MHC-I) que são cruciais para o sistema imune do hospedeiro e para o ciclo de replicação viral. Entre os componentes da maquinaria de tráfego de proteínas requeridos para as atividades de Nef estão as proteínas adaptadoras (APs), que são complexos heterotetraméricos que medeiam a seleção de carga no transporte vesicular de proteínas. Estudos anteriores demonstraram que a proteína do hospedeiro SERINC5 é um inibidor da infectividade do HIV-1 e é neutralizado por Nef. A infectividade de virions contendo SERINC5 é diminuída. Por esse motivo, Nef remove SERINC5 da membrana plasmática prevenindo sua incorporação em novas partículas virais que estão sendo formadas. O presente estudo tem o objetivo de elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na regulação do tráfego intracelular utilizados por Nef para prevenir a ação antiviral de SERINC5. Análise de microscopia de imunofluorescência mostrou que na presença de Nef, SERINC5 acumula na região justanuclear e co-localiza com marcadores do complexo de Golgi em células HeLa. Além disso, o acúmulo de SERINC5 na região justanuclear de células expressando Nef é sensível ao inibidor de Arf-GEF, brefeldina A (BFA). A depleção da subunidade $\gamma 1$ de AP-1 por siRNA compromete a regulação negativa de SERINC5 para a região justanuclear por Nef. Utilizando o ensaio de complementação bimolecular da fluorescência (BiFC), mostramos que Nef interage com a subunidade $\mu 1A$ da proteína adaptadora 1 (AP-1) do hospedeiro em regiões intracelulares contendo SERINC5. Mostramos também que perturbando a via ESCRT, pela expressão de HRS-GFP como dominante negativo ou de um mutante de VPS4 (VPS4-E/Q), ocorre a redistribuição de SERINC5 regulado negativamente por Nef para endossomos aumentados. Em conjunto, os resultados sugerem que Nef remove SERINC5 dos locais de montagem do HIV-1 alterando o tráfego intracelular de SERINC5 via interação com AP-1. Este estudo contribuiu para um melhor entendimento da ação de Nef contra SERINC5 e sobre a patogênese do HIV-1.

ABSTRACT

Czernisz, E. S. **Actions of HIV-1 Nef on the intracellular trafficking machinery to counteract the restriction factor SERINC5**. 2018. 67 p. Doctoral thesis. Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Nef is an accessory protein encoded by HIV-1 that enhances the infectivity of the HIV-1 progeny. Nef subverts the protein trafficking machinery to robustly downregulate cell surface molecules (including CD4 and MHC-I) that are crucial in the host immune system and viral replication cycle. Among the components of the protein trafficking machinery required for Nef's activities are the adaptor proteins (APs), which are heterotetrameric complexes that mediate cargo-protein sorting in vesicular trafficking. Previous studies demonstrated that the host protein SERINC5 is an inhibitor of HIV-1 infectivity and is counteracted by Nef. Virions containing SERINC5 have a diminished ability to infect target cells. Therefore, Nef removes SERINC5 from the plasma membrane preventing its incorporation into newly formed viral particles. The present study aims to elucidate the molecular mechanisms involved in regulation of the intracellular traffic used by Nef to prevent SERINC5 antiviral action. Immunofluorescence microscopy analysis showed that in the presence of Nef, SERINC5 accumulates in the juxtannuclear region and colocalizes with Golgi markers in HeLa cells. Moreover, SERINC5 accumulation in juxtannuclear region of Nef-expressing cells is sensitive to Arf-GEF inhibitor brefeldin A (BFA). The depletion of AP-1 γ 1 subunit by siRNA compromises SERINC5 downregulation to the juxtannuclear region by Nef. Using bimolecular fluorescent complementation (BiFC) assays, we show that Nef interacts with the μ 1A subunit of host adaptor protein 1 (AP-1) in intracellular sites containing SERINC5. We also show that perturbing the ESCRT pathway, by expression of HRS or a mutant of VPS4 (VPS4-E/Q), redistributes Nef-downregulated SERINC5 to enlarged endosomes. Taken together, our results suggest that Nef removes SERINC5 from HIV-1 assembly sites by altering the intracellular trafficking of SERINC5 via the interaction with AP-1. This study contributed to a better understanding of Nef's action against SERINC5 and about the pathogenesis of HIV-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de pessoas vivendo com HIV segundo a Organização Mundial da Saúde.

Figura 2. Visão geral do ciclo replicativo do HIV.

Figura 3. Fase tardia do ciclo replicativo do HIV-1.

Figura 4. Genoma e proteínas do HIV-1.

Figura 5. Estrutura e maturação das partículas de HIV-1.

Figura 6. Formação do poro de fusão do HIV-1.

Figura 7. Proteínas da superfície celular reguladas por Nef.

Figura 8. Desenho da estrutura de Nef de HIV-1.

Figura 9. Estrutura dos complexos AP-1, AP-2 e AP-3.

Figura 10. Desenho das vias endocítica e secretória mostrando os adaptadores de carga.

Figura 11. Ativação de Arf para recrutar efetores e ação da Brefeldina A.

Figura 12. Composição da maquinaria ESCRT.

Figura 13. As proteínas SERINC inibem a entrega do capsídeo na célula alvo.

Figura 14. Isoformas de SERINC5.

Figura 15. O loop citoplasmático longo de SERINC5 humano é sensível à atividade de Nef.

Figura 16. Regiões de SERINC5-HA reconhecidas pelos anticorpos anti-SERINC5 e anti-HA.

Figura 17. Sequência de procedimentos para silenciamento de γ 1-adaptina (subunidade do complexo AP1) induzido por siRNA em células HeLa CCL2.

Figura 18. Esquema do ensaio bimolecular de complementação da fluorescência (BiFC).

Figura 19. Nef altera a distribuição de SERINC5 em células HeLa CCL-2.

Figura 20. Co-localização de SERINC5 com marcadores do Golgi em células HeLa CCL-2.

Figura 21. Acúmulo de SERINC5 na região do Golgi em células expressando Nef é sensível à Brefeldina A (BFA).

Figura 22. Depleção da subunidade γ 1 de AP-1 em células HeLa.

Figura 23. Depleção da subunidade $\gamma 1$ de AP-1 previne a re-distribuição de SERINC5 para a região justanuclear induzido por Nef.

Figura 24. Nef interage com a subunidade $\mu 1A$ do complexo proteína adaptadora 1 (AP-1) no ensaio BIFC e co-localiza com SERINC5.

Figura 25. Rab 5 GTPase está envolvida na regulação negativa de SERINC5 por Nef.

Figura 26. Acúmulo de SERINC5 em endossomos de células expressando Nef e dominantes negativos da maquinaria ESCRT.

Figura 27. Alix não co-localiza com SERINC5 no ensaio BiFC.

Figura 28. Inibição lisossomal ou proteassomal não leva ao aumento de SERINC5.

Figura 29. Regulação negativa de SERINC5 na superfície de linfócitos T expressando Nef/GFP.

Figura 30. A regulação negativa de SERINC5 por Nef previne sua incorporação nos vírions.

Figura 31. Modelo proposto para o transporte intracelular de SERINC5 em células expressando Nef.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise quantitativa da co-localização entre sinais de SERINC5 e marcadores do Golgi (TGN46 e Giantina).

Tabela 2. Análise quantitativa da co-localização entre os sinais de SERINC5 e AP1 γ 1.

Tabela 3. Análise quantitativa da co-localização entre os sinais de SERINC5, BiFC e AP1 γ 1.

Tabela 4. Análise quantitativa da co-localização entre sinais de SERINC5 e de dominantes negativos da maquinaria ESCRT em células HeLa CCL2 expressando Nef.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AIDS - síndrome da imunodeficiência adquirida
- APs - proteínas adaptadoras
- Arf1 - fator de ribosilação do difosfato de adenosina
- BFA - brefeldina A
- cART - terapia antirretroviral combinada
- CA – capsídeo
- CCVs - vesículas revestidas por clatrina
- DNM2 – dinamina 2
- ESCRT - *endosomal sorting complexes required for transport*
- ICL4 - loop citoplasmático interno 4
- ILVs - vesículas intraluminais
- LZ - zipper de leucina
- MA - proteína da matrix
- MPER - região extracelular membrana proximal
- MHC-I - Complexo Principal de Histocompatibilidade classe I
- MVBs - corpos multivesiculares
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- ORF - *open reading frames*
- SERINC - Serine incorporator
- SFKs - família de quinases Src
- siRNA - *small interfering RNA*
- SIV - vírus da imunodeficiência símia
- RER - retículo endoplasmático rugoso
- TGN - *trans*-Golgi network

SUMÁRIO

1. Introdução.....	2
1.1. O vírus HIV-1 e a AIDS.....	2
1.2. Ciclo de replicação do HIV-1	3
1.3. Genoma e proteínas do HIV-1.....	5
1.4. Maturação da partícula de HIV-1	6
1.5. Formação do poro de fusão do HIV-1	7
1.6. A proteína acessória Nef: aspectos gerais	8
1.7. Regulação negativa de CD4 e MHC-I	10
1.8. Transporte de proteínas mediado por adaptadores de carga e clatrina	11
1.9. Formação de vesículas mediada por AP-1	13
1.10. Maquinaria ESCRT na biogênese de MVBs.....	14
1.11. Visão geral sobre as proteínas SERINC e seu mecanismo de ação.....	15
1.12. Nef neutraliza a ação de SERINC5 através da via endocítica.....	17
1.13. Fatores que determinam a interação entre Nef e SERINC5	18
2. Objetivos	22
2.1. Objetivo Geral	22
2.2. Objetivos Específicos.....	22
3. Materiais e Métodos.....	24
3.1. Linhagens Celulares.....	24
3.2. Plasmídeos de Expressão	24
3.3. Preparações de DNA plasmideal.....	26
3.4. Anticorpos.....	27
3.5. Transfecções.....	28
3.6. Silenciamento induzido por siRNA (<i>small interfering RNA</i>)	28
3.7. Tratamento de células com drogas	29
3.8. Ensaio de Complementação bimolecular da fluorescência (BiFC).....	29
3.9. Imunofluorescência e Microscopia confocal	30
3.10. Análise Estatística	31
3.11. SDS-PAGE e <i>Western blotting</i>	31
3.12. Citometria de Fluxo	32
3.13. Produção de vírus.....	33
4. Resultados	35
4.1. Nef induz redistribuição de SERINC5 da membrana plasmática para região justanuclear	35

4.2.	SERINC5 encontra-se na região do Golgi na presença de Nef	37
4.3.	AP-1 está envolvido na regulação negativa de SERINC5 por Nef.....	39
4.4.	Envolvimento de endossomos primários na ação de Nef contra SERINC5	43
4.5.	Evidencia de que Nef direciona SERINC5 para a via dos corpos multivesiculares (MVBs) utilizando a maquinaria ESCRT	45
4.6.	Caracterização da regulação negativa de SERINC5 em células T (linhagem A3.01) expressando Nef.....	48
4.7.	A retirada de SERINC5 da superfície celular por Nef evita sua incorporação nas partículas virais	49
5.	Discussão	52
6.	Conclusão	59
7.	Referências	61

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. O vírus HIV-1 e a AIDS

Uma das primeiras evidências documentada da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) foi através da análise de uma amostra de plasma coletada em 1959. A amostra pertencia a um homem africano da região do Congo, e fez parte de um amplo estudo sorológico que envolveu amostras coletadas entre os anos de 1959 e 1982. Denominada de L70, a amostra apresentou-se positiva para HIV-1 através de ensaios de imunofluorescência, *western blotting* e radioimunoprecipitação (Nahmias et al., 1986). Somente durante a década de 1980 a infecção pelo vírus começou a receber maior atenção do mundo e o HIV-1 ficou conhecido como causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Desde então muitos estudos foram realizados em busca de potentes antirretrovirais para o HIV. Os tratamentos mais efetivos da atualidade conseguem apenas suprimir a replicação, mas não promovem a erradicação do vírus. O HIV-1 é um retrovírus do gênero Lentivirus, responsável por uma infecção que ainda hoje se apresenta como crônica e incurável, mesmo sendo um dos vírus mais bem caracterizados quanto a sua biologia, transmissão e patogênese (Barré-Sinoussi et al., 2013).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2016), em torno de 37 milhões de pessoas, a maioria residente em países pobres, vivem com o vírus (figura 1). O declínio de linfócitos T CD4⁺ na corrente sanguínea provocado pela entrada do HIV-1 nestas células e o consequente aumento de infecções oportunistas são as causas das manifestações clínicas da AIDS. A carga viral do plasma pode ser diretamente relacionada com a progressão da doença (Mellors et al., 1996). Após infectar linfócitos CD4⁺, ocorre o desenvolvimento da resposta imune e o controle da viremia com a ativação de linfócitos T citotóxicos vírus específicos CD8⁺, iniciando a fase crônica da infecção (Deeks et al., 2015; Freed, 2015).

Um grande salto para a ciência médica na década de 1990 foi o desenvolvimento de uma terapia antirretroviral combinada (cART) para combater a infecção pelo HIV. Esta terapia é capaz de prevenir a infecção de novas células, mesmo que o genoma viral continue integrado ao genoma da célula. A cART inclui uma combinação de inibidores farmacológicos de enzimas virais importantes em várias fases do ciclo de replicação. As células T CD4⁺ são o principal alvo do HIV e muitas morrem durante a infecção. Porém,

uma pequena parcela de células infectadas entra em um estado metabólico inativo, são as células de memória, que podem persistir por décadas mesmo na presença da terapia antirretroviral. Este reservatório é considerado o maior desafio para a cura do HIV, pois pacientes que interrompem a terapia tem a carga viral reconstituída mesmo após anos de tratamento (Laskey e Siciliano, 2014).

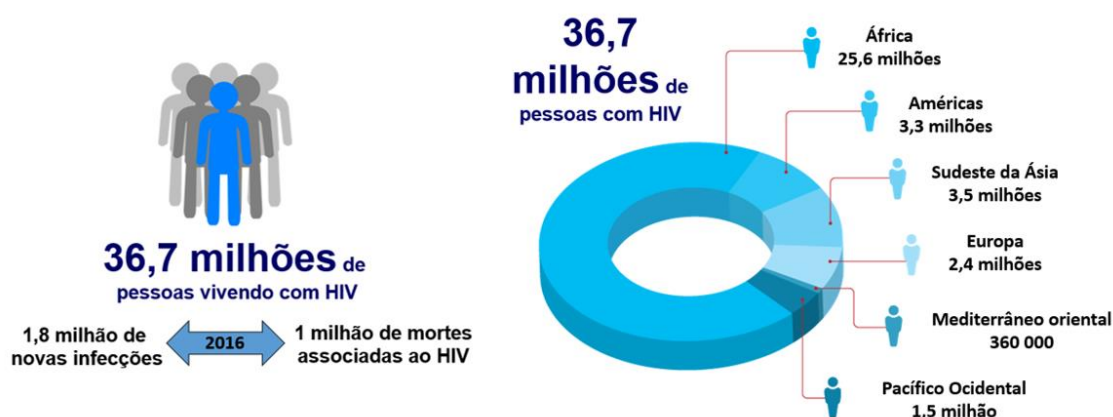


Figura 1. Número de pessoas vivendo com HIV segundo a Organização Mundial da Saúde. Novas infecções continuam ocorrendo a cada ano, assim como milhares de mortes, totalizando mais de 36 milhões de pessoas vivendo com HIV em várias regiões do mundo. Modificado de: HIV, dados e estatística, publicado por OMS (2016).

1.2. Ciclo de replicação do HIV-1

A fase inicial do ciclo de replicação do HIV-1 compreende eventos que vão desde a ligação do vírus na membrana plasmática até a integração do DNA viral com o genoma da célula hospedeira. A entrada do vírus nas células alvo é mediada pela ligação da glicoproteína viral ENV com o receptor CD4 e um co-receptor que pode ser o receptor de quimiocina CCR5 ou CXCR4. O genoma do HIV é constituído por duas cópias de RNA de fita simples que com o auxílio da transcriptase reversa viral é transcrito para DNA dupla fita. Após ser liberado do capsídeo, o DNA viral é importado para o núcleo e integrado ao genoma da célula hospedeira pela integrase viral. O genoma do HIV é transcrito em RNA pela enzima RNA polimerase II da célula. Em linfócitos T CD4⁺ ativados, o genoma do HIV é transcrito e traduzido para produzir as proteínas virais que se montam em novos vírions (figura 2) (Deeks et al., 2015; Freed, 2015).

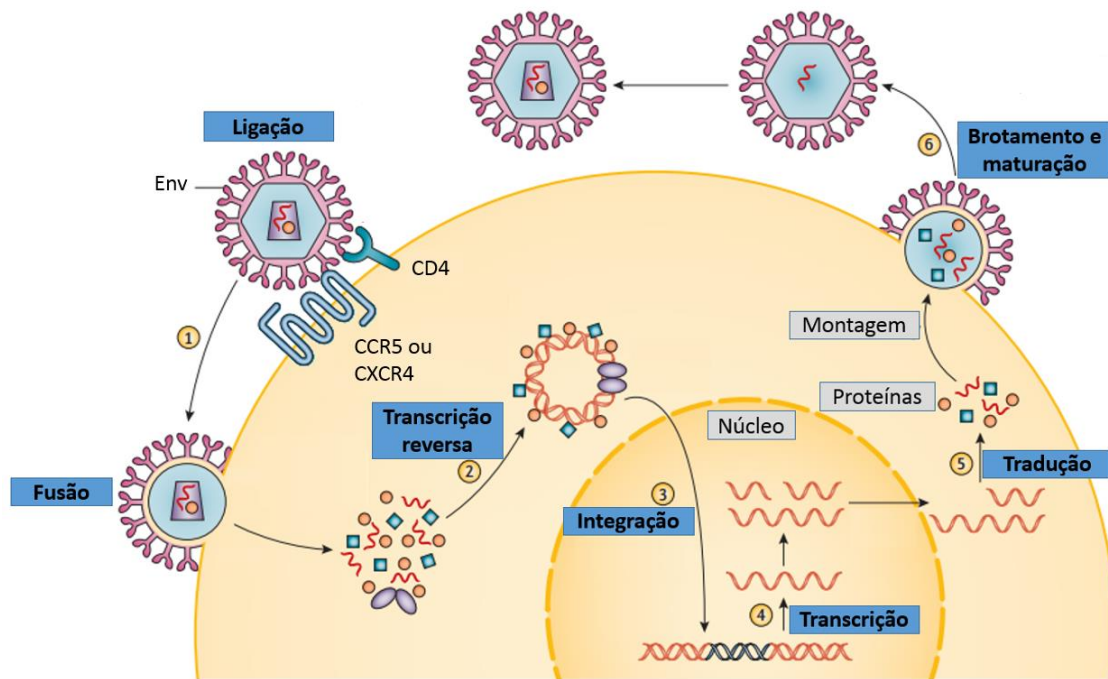


Figura 2. Visão geral do ciclo replicativo do HIV. Primeiro ocorre a ligação de Env com o receptor CD4 e com o co-receptor CCR5 ou CXCR4, seguido da fusão e entrega do capsídeo no citoplasma (1). A partir do RNA viral fita simples é produzido um DNA fita dupla através da ação da transcriptase reversa (2). O DNA viral é importado para o núcleo e integrado no genoma da célula (3). Ocorre a transcrição (4) e consequente produção de RNA viral que é exportado para o citoplasma onde ocorre a tradução das proteínas virais (5) e montagem do novo vírion. Modificado de: Deeks et al., 2015.

A fase tardia da replicação compreende a expressão gênica viral, montagem e liberação de novas partículas virais. Após a transcrição, o RNA viral sai do núcleo e vai para o citoplasma onde ocorre a tradução e produção das poliproteínas Gag e GagPol. A proteína Env é produzida através da via secretória celular passando pelo retículo endoplasmático rugoso (RER) e pelo complexo de Golgi, sendo então carregada por vesículas até a membrana plasmática. Na membrana plasmática Gag é ancorado em regiões específicas caracterizadas como *lipid rafts* e recruta o RNA genômico viral. Ocorre a incorporação de Env e a montagem do HIV-1. No momento do brotamento do vírus, proteínas da maquinaria ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*) são recrutadas para a membrana e são responsáveis pela fissão e separação completa da partícula viral (figura 3) (Freed, 2015).

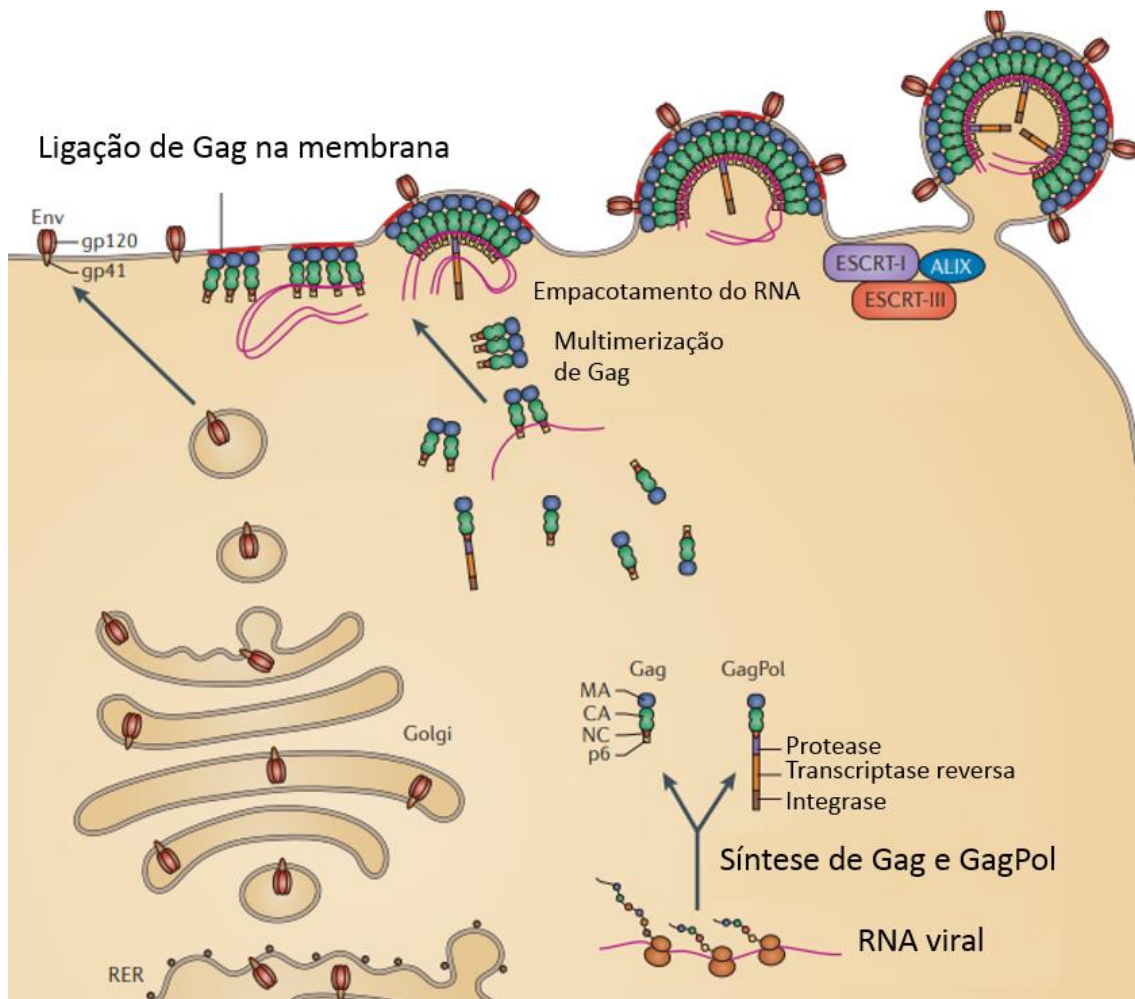


Figura 3. Fase tardia do ciclo replicativo do HIV-1. A proteína Env é produzida na via endocítica celular e as poliproteínas Gag e GagPol são traduzidas no citoplasma. A montagem do vírus e empacotamento do RNA ocorrem na membrana plasmática da célula. A maquinaria ESCRT é recrutada durante o brotamento do vírus. Modificado de: Freed, 2015.

1.3. Genoma e proteínas do HIV-1

O genoma viral que é integrado ao genoma da célula hospedeira contém fases abertas de leitura (ORF, *open reading frames*) para 16 proteínas que são sintetizadas a partir de dez transcritos: Gag, Pol, Vif, Vpr, Vpu, Tev, Rev, Tat, Env e Nef (figura 4, parte superior). Os precursores Gag e GagPol são clivados no citoplasma pela protease viral dando origem a nove polipeptídeos: protease, transcriptase reversa, integrase, matriz, capsídeo, p2, nucleocapsídeo, p1 e p6. O precursor Env (gp160) é clivado por proteases celulares em gp120 e gp41 (figura 4, parte inferior). Os genes *gag*, *pol* e *env* são responsáveis pela estrutura viral e pelos fatores enzimáticos (Peterlin e Trono, 2003).

O HIV-1 também codifica as proteínas regulatórias Tat e Rev, a primeira é responsável pela ativação da transcrição e a segunda é uma proteína reguladora da

expressão gênica. Já as proteínas acessórias do HIV: Nef, Vif, Vpr e Vpu, são muito importantes para otimizar o ambiente de replicação viral *in vivo* (Peterlin e Trono, 2003).

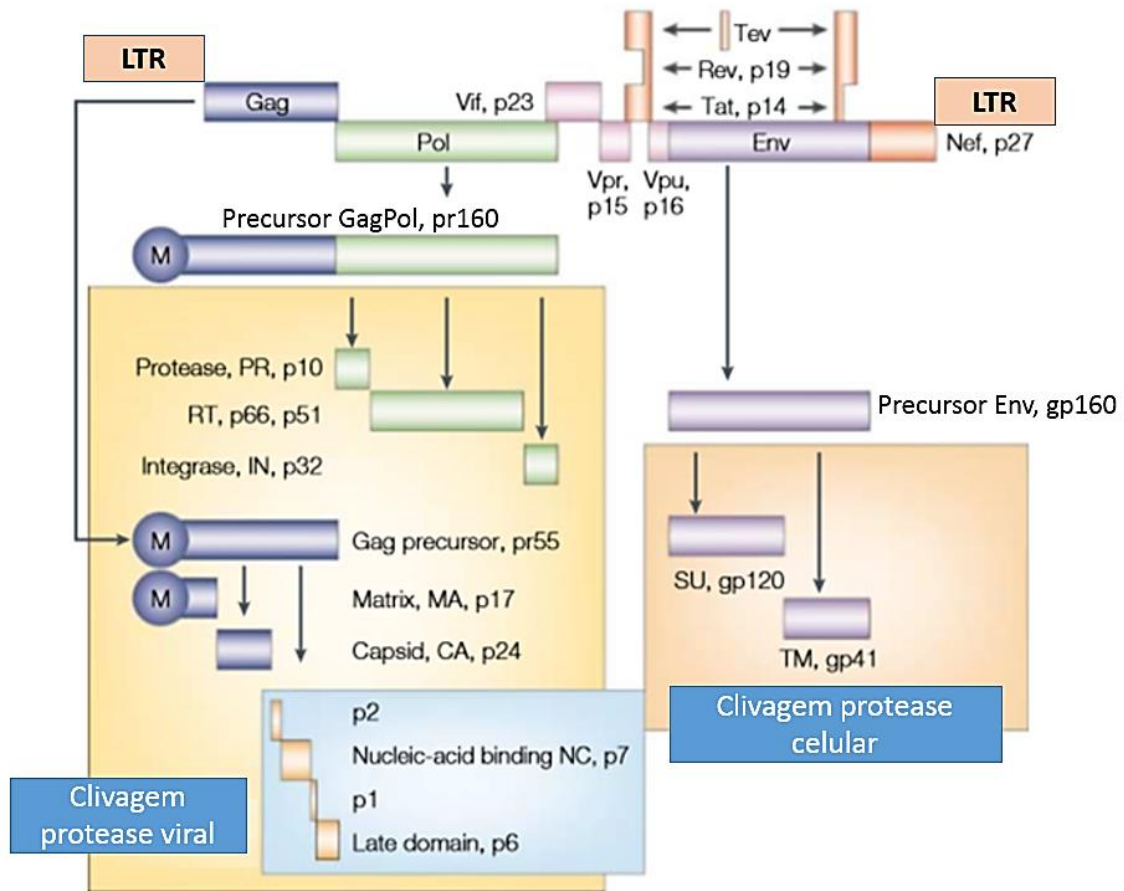


Figura 4. Genoma e proteínas do HIV-1. Parte superior: genoma viral que é incorporado no DNA da célula. Parte inferior: processamento das proteínas provenientes do transcrito viral. Os precursores Gag (pr55) e GagPol (pr160) são clivados pela protease viral, e o precursor Env (gp160) é clivado pela protease celular. Adaptado de: Peterlin e Trono, 2003.

1.4. Maturação da partícula de HIV-1

Após o vírus brotar da célula ocorre a maturação da partícula, processo no qual uma protease cliva poliproteínas virais em subunidades funcionais para formar a partícula infecciosa. A poliproteína Gag da partícula imatura é clivada dando origem à proteína do capsídeo (CA), proteína da matrix (MA), proteína do nucleocapsídeo e peptídeo p6. Em seguida, o capsídeo é montado no centro da partícula viral madura, sendo constituído por uma camada proteica externa que envolve o genoma de RNA viral e as enzimas transcriptase reversa e integrase, além de algumas proteínas acessórias. Na partícula madura as proteínas Env ganham maior mobilidade e podem se movimentar na membrana

viral assim como se organizar em trimeros (figura 5) (Campbell e Hope, 2015; Jakobsdottir et al., 2017).

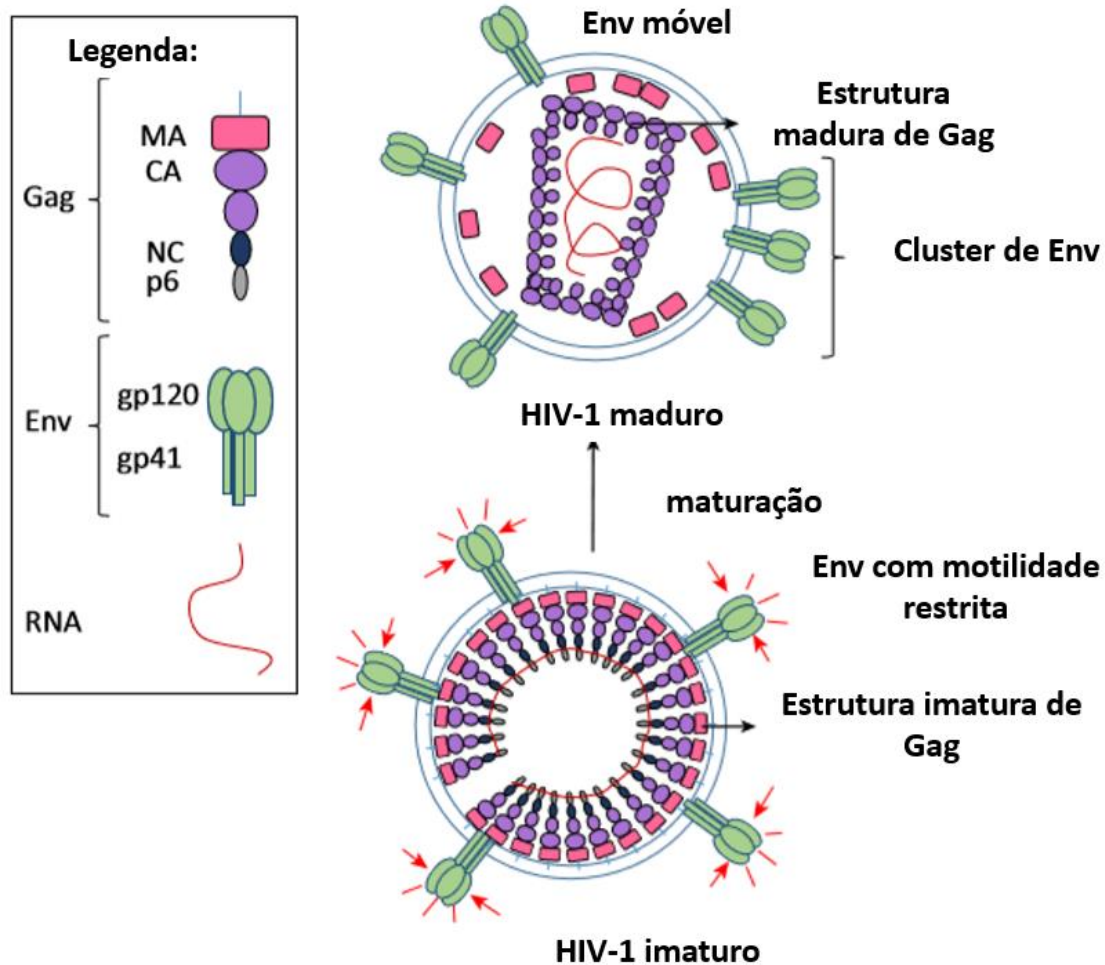


Figura 5. Estrutura e maturação das partículas de HIV-1. Em partículas imaturas de HIV-1, a estrutura rígida de Gag restringe a mobilidade de Env. Já nas partículas maduras, as glicoproteínas Env conseguem se movimentar na membrana viral e também se organizar em *cluster*. Legenda: detalhes da constituição de Gag e Env. Modificado de: Jakobsdottir et al., 2017.

1.5. Formação do poro de fusão do HIV-1

O HIV-1 é capaz de entrar em uma célula por endocitose ou fusão, dependendo do tecido e tipo celular (linfócitos CD4⁺, macrófagos e células dendríticas). Para isso, o HIV-1 utiliza diferentes estratégias que compreendidas podem significar um avanço no desenvolvimento de drogas antivirais e anticorpos neutralizantes que atuam na fase de entrada do vírus na célula. Algumas proteínas celulares como SERINC3, SERINC5 e IFITMs atuam naturalmente restringindo a fusão do HIV-1 com a célula alvo (Jakobsdottir et al., 2017).

A fusão do HIV-1 com a membrana plasmática de linfócitos é muito bem caracterizada e para ocorrer depende de rearranjos estruturais da glicoproteína Env viral. Env é composto por duas porções distintas: gp41 que é uma subunidade transmembrana, e gp120 uma porção externa que se liga aos receptores celulares (Env, figura 5). Na porção N-terminal de gp41 encontram-se resíduos hidrofóbicos que constituem o peptídeo de fusão do HIV-1. Após ocorrer a ligação de Env ao receptor e co-receptor, mudanças conformacionais de Env facilitam a inserção do peptídeo de fusão na membrana plasmática da célula. Posteriormente, as membranas viral e celular se fundem e o poro de fusão é formado. Uma proteína celular, a dinamina 2, auxilia na estabilização do poro. Apenas com a correta formação do poro de fusão que o HIV-1 é capaz de fazer a entrega do capsídeo viral (figura 6) (Kong et al., 2016; Jakobsdottir et al., 2017).

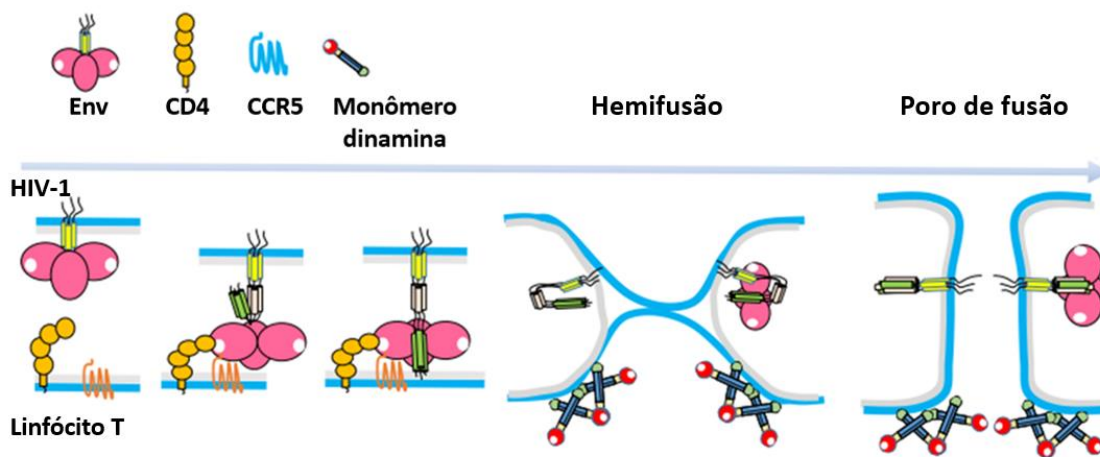


Figura 6. Formação do poro de fusão do HIV-1. O primeiro evento na formação do poro de fusão é a ligação de Env ao receptor CD4 e co-receptor CCR5. Durante a hemifusão os folhetos externos das bicamadas lipídicas se conectam e se fundem, neste momento o peptídeo de fusão do HIV-1 é inserido. Em seguida ocorre a fusão das membranas internas formando o poro. A dinamina 2 (DNM2) é responsável por estabilizar o poro de fusão. Modificado de: Jakobsdottir et al., 2017.

1.6. A proteína acessória Nef: aspectos gerais

Uma das principais funções de Nef é manipular componentes celulares para uma eficiente replicação do HIV, sendo o fator determinante na patogênese e progressão da infecção. Esta função de Nef já foi comprovada em camundongos e em humanos. Nef atua de diversas maneiras e é responsável por interagir com a maquinaria de tráfego intracelular e evasão do sistema imune através da regulação de várias proteínas da superfície celular, incluindo o receptor CD4, imunoreceptores, transportadores de membrana e fatores de restrição (figura 7). Além disso, atualmente tem-se atribuído à Nef a função de aumentar a infectividade de novas partículas virais através de ação na célula

produtora de vírus. Para tanto, esse fator viral é abundantemente expresso logo no início da infecção. Nef tem massa molecular de 27 a 35 kDa e é uma proteína solúvel, miristoilada na região N-terminal (miristato adicionado pós-transcricionalmente à um resíduo de glicina na posição aa 2), sendo esse motif lipídico essencial para sua associação com membranas celulares. A estrutura tridimensional de Nef já foi determinada e ela é expressa em HIV-1, HIV-2, e no vírus da imunodeficiência símia (SIV) (Pereira e daSilva, 2016).

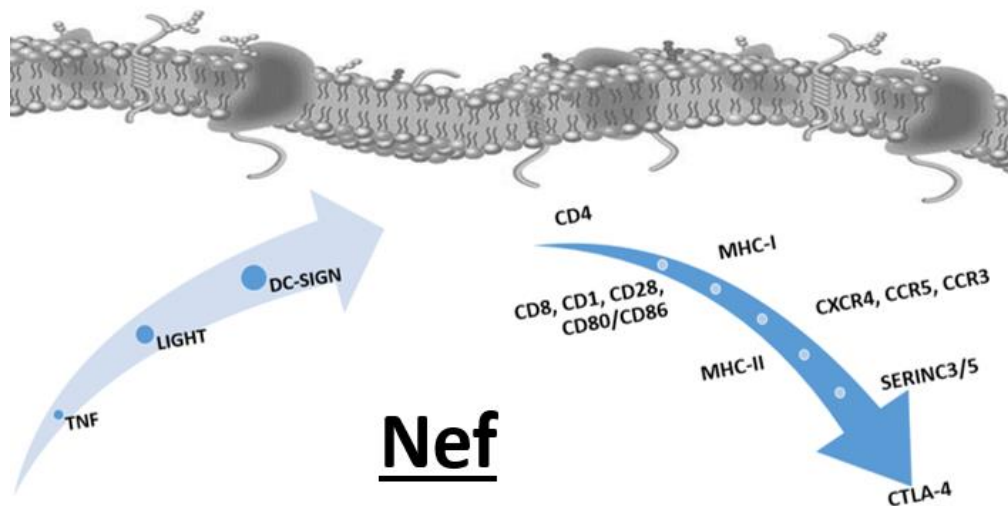


Figura 7. Proteínas da superfície celular reguladas por Nef. Seta para cima indica as proteínas que tem seus níveis de expressão aumentados na membrana plasmática na presença de Nef. Seta para baixo indica algumas proteínas cujos níveis na membrana plasmática diminuem.

A região N-terminal de Nef é flexível (aa 1-57), e seguida de uma região globular compacta (aa 58-149, 181-206) e uma região C-terminal em forma de “loop” (aa 150-180). Nef é capaz de fazer conexões entre a molécula alvo e componentes da maquinaria vesicular alterando o tráfego de proteínas de membrana e direcionando-as para lisossomos ou para o TGN (*trans*-Golgi network). Dentro da região C-terminal de Nef, dois motifs se destacam. O motif (aa160)ExxxLL(aa165), responsável pela interação com membros da família de proteínas adaptadoras (AP1 e AP2, revisado no item 1.8); e (aa155)EE(aa156) que interage com a subunidade β -COP, outra proteína reguladora do tráfego vesicular. Dentro da região globular, os motifs (aa72)PxxP(aa75) e (aa62)EEEE(aa65), se ligam com família de quinases Src (SFKs) e com proteínas PACS-1 e 2, respectivamente (figura 8) (Sugden et al., 2016).

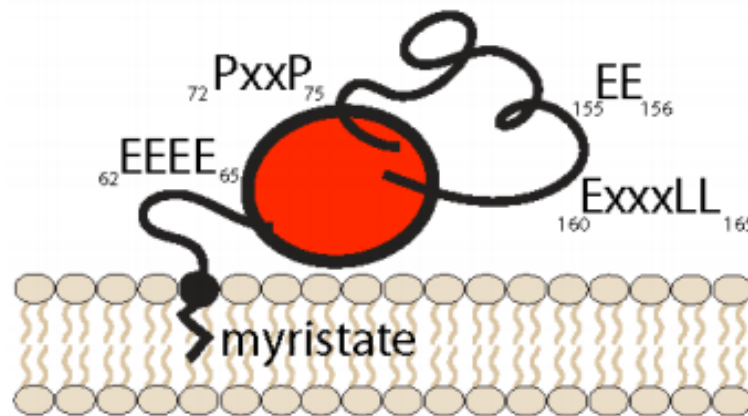


Figura 8. Desenho da estrutura de Nef de HIV-1. Nef é uma proteína miristoilada na região N-terminal seguido de uma região globular contendo os motifs (aa62)EEEE(aa65) e (aa72)PxxP(aa75). Na região C-terminal em forma de “loop” encontram-se os motifs (aa155)EE(aa156) e (aa160)ExxxLL(aa165). Fonte: Sugden et al., 2016.

1.7. Regulação negativa de CD4 e MHC-I

As funções melhor conhecidas de Nef atualmente compreendem a regulação negativa das moléculas CD4 e Complexo de Histocompatibilidade classe I (MHC-I). Estas proteínas são produzidas no retículo endoplasmático, passam pelo complexo de Golgi e são enviadas para a membrana plasmática através da via constitutiva, onde desempenham suas funções biológicas. O principal receptor para o HIV-1 em linfócitos e macrófagos é o CD4 (Pereira e daSilva, 2016). Nef executa um mecanismo que resulta na diminuição de CD4 da superfície das células com várias consequências vantajosas para o vírus. Entre eles, evitando a morte precoce das células por super-infecção (Benson et al., 1993). A regulação negativa de CD4 é uma característica de Nef que está diretamente ligada aos seus efeitos na patogênese do HIV aumentando muito a eficiência da infecção (Lama 2003). O CD4 é removido da membrana plasmática por Nef e enviado para degradação nos lisossomos, o motif dileucina de Nef é fundamental para essa função (Aiken et al., 1994). A regulação negativa de CD4 é dependente de clatrina e de AP-2, complexo heterotetramérico envolvido na endocitose de proteínas da membrana plasmática das células (Chaudhuri et al., 2007).

O mecanismo de regulação negativa do MHC-I por Nef parece ser diferente do descrito para CD4, e tem como benefício principal para o vírus, a evasão do sistema imune ao evitar que células infectadas sejam identificadas e destruídas por linfócitos T citotóxicos (Schwartz et al., 1996). Nesse sentido, Nef atua na membrana do TGN e

recruta moléculas de MHC-I para o interior de vesículas de clatrina via AP-1. Uma vez em endossomos primários, MHC-I é direcionado para degradação em lisossomos através da via dos corpos multivesiculares (MVBs) (Donaldson e Williams, 2009). Ensaios de interação de proteínas e a determinação de estrutura cristalográfica, identificaram a subunidade $\mu 1$ de AP-1 como chave para a formação do complexo tripartite AP-1/Nef/MHC-I (Noviello et al., 2008; Wonderlich et al., 2008). Existem duas linhas de estudo que tentam explicar o mecanismo pelo qual Nef atua sobre MHC-I e a maquinaria de tráfego intracelular e alguns autores consideram que ambas as vias possam ocorrer ao mesmo tempo. O outro mecanismo consiste no envolvimento de Nef no transporte retrógrado de MHC-I. Neste caso, MHC-I é endocitado para endossomos primários e depois enviado para retenção no TGN, processo que também dependeria da formação do complexo tripartite com AP-1 e MHC-I. Ao mesmo tempo, a reciclagem de MHC-I dos endossomos iniciais para a membrana seria inibida por Nef (Pereira e daSilva, 2016).

1.8. Transporte de proteínas mediado por adaptadores de carga e clatrina

A seleção das proteínas que serão carreadas e as rotas de transporte entre o TGN, os endossomos e membrana plasmática, nas vias endocítica/secretória, são finamente reguladas por proteínas que compõem o revestimento de vesículas de transporte (figura 10). Em muitos casos a seleção de proteínas a serem transportadas é mediada por uma família de complexos adaptadores, também chamados proteínas adaptadoras (APs). Os APs se ligam diretamente em regiões específicas da proteína alvo como a cauda citosólica de proteínas transmembrana, ou em receptores transmembrana que, por sua vez, se ligam a uma carga solúvel. As proteínas alvo são concentradas em vesículas para o posterior transporte entre os compartimentos celulares. Nesse sentido, os APs também se ligam a outras proteínas de revestimento (como por exemplo: clatrina) com a propriedade de deformar membrana para a formação da vesícula de transporte (Robinson, 2015).

Os APs são complexos heterotetraméricos formados por duas subunidades grandes chamadas adaptinas ($\beta 1$ -adaptina e γ -adaptina (AP-1); $\beta 2$ -adaptina e α -adaptina (AP-2); $\beta 3$ -adaptina e δ -adaptina (AP-3)), uma subunidade média chamada μ e uma pequena σ (figura 9) (Robinson, 2015). Neste contexto, já foi estabelecido que Nef pode interagir com AP-2, que é formado pelas subunidades α , $\beta 2$, $\mu 2$ e $\sigma 2$, e também com os outros complexos AP-1 ($\gamma 1$, $\beta 1$, $\mu 1$ e $\sigma 1$) e AP-3 (δ , $\beta 3$, $\mu 3$ e $\sigma 3$) (figura 9) (Chaudhuri et al., 2007; Doray et al., 2007; Janvier et al., 2003; Mattera et al., 2011). Os APs medeiam

o transporte e formação de vesículas carreadoras entre diferentes organelas, sendo que AP-1, AP-2 e AP-3 medeiam a formação de vesículas revestidas por clatrina (CCVs). AP-1 atua no TGN e em endossomos primários. AP-2 na endocitose e AP-3 no tráfego para lisossomos (figura 10) (Robinson, 2015; Paczkowski, 2015; Bonifacino, 2014).

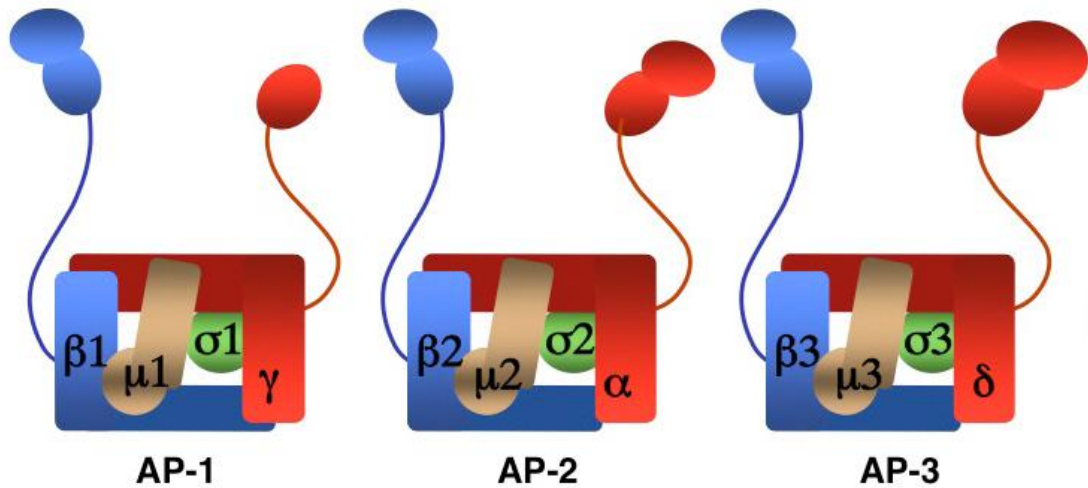


Figura 9. Estrutura dos complexos AP-1, AP-2 e AP-3. Os APs são complexos heterotetraméricos formados por duas subunidades grandes, uma média e uma pequena. Fonte: <https://annualreport.nichd.nih.gov>.

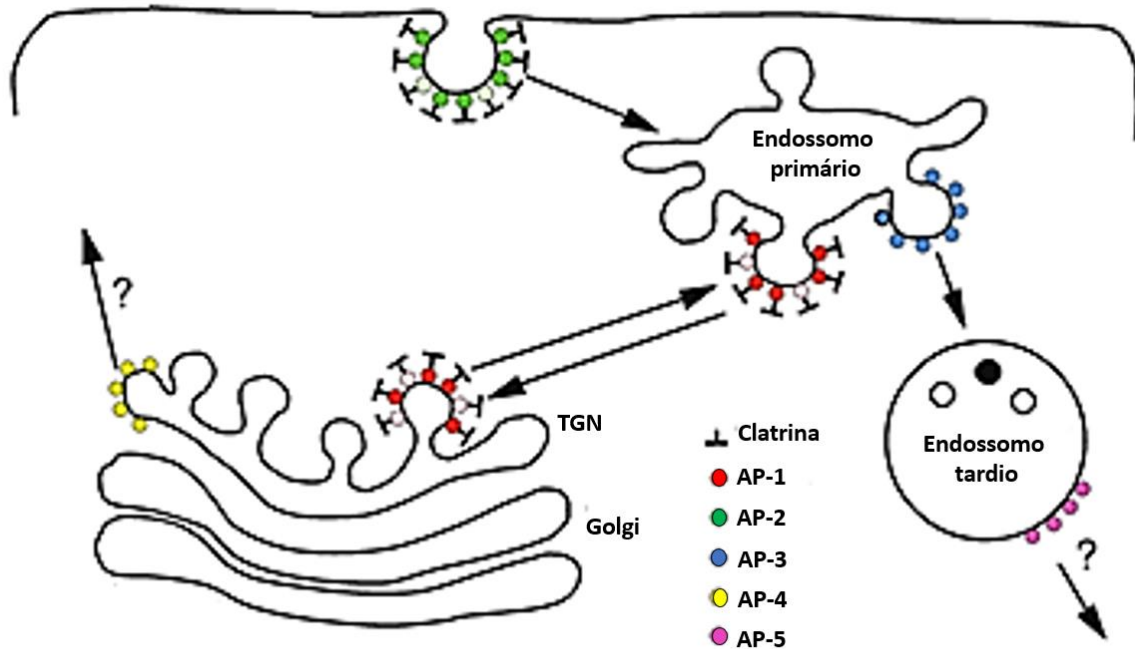


Figura 10. Desenho das vias endocítica e secretória mostrando os adaptadores de carga. As proteínas adaptadoras AP-1, AP-2, AP-3, AP-4 e AP-5 medeiam a formação de vesículas para o transporte de moléculas entre compartimentos intracelulares. Modificado de: Robinson, 2015.

1.9. Formação de vesículas mediada por AP-1

O recrutamento de AP-1 para seus locais de atuação, TGN e endossomos, é dependente de interações com a GTPase Arf1 (fator de ribosilação do difosfato de adenosina), o fosfolípido PI(4)P e proteínas carga. A ligação de duas moléculas de Arf1-GTP parece ser suficiente para a estabilização de um complexo AP-1 com conformação favorável aos outros dois ligantes. O que determina a ligação de AP-1 à moléculas carga são os motifs presentes em sua cauda citosólica: os baseados em tirosina YXXΦ que se ligam à sua subunidade μ 1, e os baseados em dileucina de sequência [D/E]XXXL[L/I/M] que se ligam ao hemicomplexo formado pelas subunidades γ/σ (Lee et al., 2008; Paczkowski et al., 2015).

As proteínas Arf são pequenas GTPases que atuam como reguladores importantes no tráfego vesicular. Arfs classe I (Arf1, Arf2 e Arf3) e classe II (Arf4 e Arf5) estão concentradas no complexo de Golgi e também presentes em compartimentos endossomais. As Arfs atuam em ciclos de ativação e inativação dependendo de sua associação com GDP ou GTP, o que requer da função de GEFs, fatores de troca de nucleotídeos de guanina. As GEFs catalisam uma reação de troca de GDP por GTP ativando as Arfs que são GTPases. As Arfs inativas localizam-se principalmente no citosol. Quando o GTP se liga à Arf, uma região miristoilada N-terminal é exposta e medeia a interação com a membrana (figura 11) (Casanova, 2007).

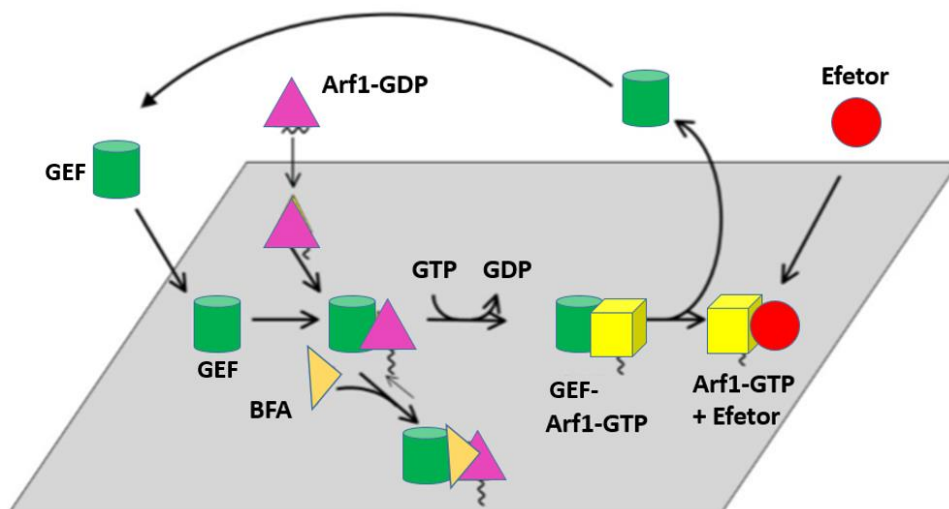


Figura 11. Ativação de Arf1 para recrutar efetores e ação da Brefeldina A. Arf1 e GEF são recrutadas para as membranas onde vão atuar. Arf1 é ativada pela troca de GDP por GTP que é executada pela GEF. O complexo Arf1-GTP recruta efetores necessários para formação de vesículas carregadas com proteínas a serem transportadas. BFA estabiliza o complexo GEF-Arf1-GDP na membrana, interrompendo o ciclo. Modificado de: Niu et al., 2005.

1.10. Maquinaria ESCRT na biogênese de MVBs

Proteínas de membrana são endocitadas e transportadas no interior da célula passando por endossomos primários. Os endossomos primários recebem carga tanto da membrana plasmática como do TGN, e um dos compartimentos de destino terminal é o lisossomo. Estudos anteriores mostraram que Nef reduz a expressão de determinadas proteínas na superfície da célula, enviando-as para corpos multivesiculares (MVBs) e finalmente para degradação nos lisossomos (daSilva et al., 2009; Schaefer et al., 2008)

A entrega de proteínas carga transmembrana para vesículas intraluminais (ILVs) de MVBs é um processo muito regulado, e em muitos casos ocorre sob o controle da maquinaria ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport). Cinco complexos (ESCRTs -0, -I, -II, e -III, e Vps4) formam a maquinaria que é capaz de reconhecer cargas e deformar membranas em direção ao lumen do endossomo (Schmidt e Teis, 2012). O complexo ESCRT-0 é composto pelas subunidades STAM e Hrs, seu papel é concentrar carga e recrutar ESCRT-I. A subunidade Hrs se liga a um fosfolipídio endossomal (PI3P), o que é considerado como ponto de partida para a formação do ESCRT-0. O componente ESCRT-I é constituído por quatro subunidades: Tsg101, Vps28, Vps37 e Mvb12. O ESCRT-II possui uma unidade Vps36, uma Vps22 e duas Vps25, e se liga ao ESCRT-I através de Vps28. A nucleação de ESCRT-III ocorre a partir de Vps25 do ESCRT-II, e o complexo é montado sendo constituído por Vps20, Vps32, Vps24 e Vps2. Vps4 é uma ATPase que é recrutada e ativada pelo ESCRT-III. Vps4 atua na maturação de MVBs e na reciclagem de toda a maquinaria. A maquinaria ESCRT funciona a partir da ligação sequencial de todos estes complexos. ESCRT-0, ESCRT-I e ESCRT-II possuem locais para ligação à proteínas ubiquitinadas (figura 12). (Raiborg e Stenmark, 2009; Henne et al., 2011).

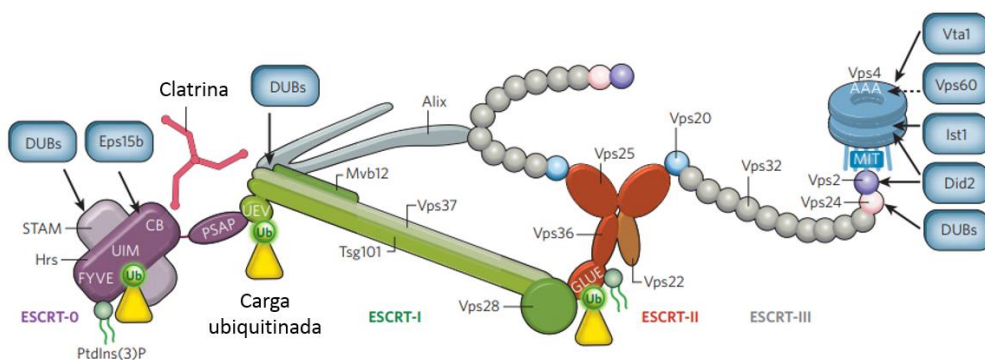


Figura 12. Composição da maquinaria ESCRT. Os complexos ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II e ESCRT-III são compostos por várias subunidades que atuam coordenadamente. Fonte: (Raiborg e Stenmark, 2009).

1.11. Visão geral sobre as proteínas SERINC e seu mecanismo de ação

A família de proteínas SERINC1-5 (Serine incorporator) é formada por proteínas que tem como característica a presença de vários domínios transmembrana e são altamente conservadas entre os eucariotos. A função biológica destas proteínas ainda é incerta, porém, estudos demonstram que elas facilitam a incorporação de serina durante a síntese dos lipídeos de membrana: fosfatidilserina e esfingolipídeos (Inuzuka et al., 2005). Após muitos anos de pesquisa para tentar entender o mecanismo pelo qual Nef aumenta a infectividade da progênie de HIV-1, dois grupos de pesquisadores liderados por Heinrich Gottlinger (Universidade de Massachusetts, EUA) e Massimo Pizzato (Universidade de Trento, Itália) apontaram uma resposta para esta importante questão. Constataram que as proteínas celulares SERINC3 e SERINC5, a última com efeito mais acentuado, são responsáveis pela diminuição da infectividade da partícula de HIV-1 (Rosa et al., 2015; Usami et al., 2015).

Neste contexto, quando o mecanismo de restrição mediado pelas proteínas SERINC é neutralizado por Nef, ocorre o aumento da infectividade viral. Os estudos indicaram que em células infectadas com HIV *wild-type*, Nef é capaz de remover SERINC da membrana plasmática evitando que esta proteína seja incorporada nos novos vírions. No momento da infecção da célula alvo, as partículas sem SERINC na membrana viral conseguem facilmente fazer a entrega do capsídeo. Em uma outra condição, quando as células produtoras de vírus foram infectadas com HIV defeituoso para Nef, as partículas brotam com SERINC na membrana viral e apresentam menor eficiência para entregar o capsídeo à célula alvo devido à defeitos na abertura do poro de fusão (figura 13) (Usami et al., 2015; Rosa et al., 2015; Aiken, 2015).

Zhang et al. (2017) demonstraram que SERINC5 inibiu fortemente a infectividade do HIV-1 quando comparado com SERINC1, SERINC2, SERINC3 e SERINC4. Além disso, mostraram que quando SERINC5 é expresso na membrana plasmática das células produtoras de vírus, e conseqüentemente incorporado nos novos vírions HIV-1, ocorre a inibição da infectividade (Zhang et al., 2017). Mesmo uma expressão ectópica de SERINC5 é capaz de inibir a infectividade de HIV-1 *wild type*, o que ressalta a importância desta proteína como potencial agente antiviral. SERINC5 também se destaca por apresentar um papel evolutivo na interação entre células e retrovírus pois sua ação ocorre tanto em HIV quanto em MLV que são vírus distantes evolutivamente (Rosa et al., 2015).

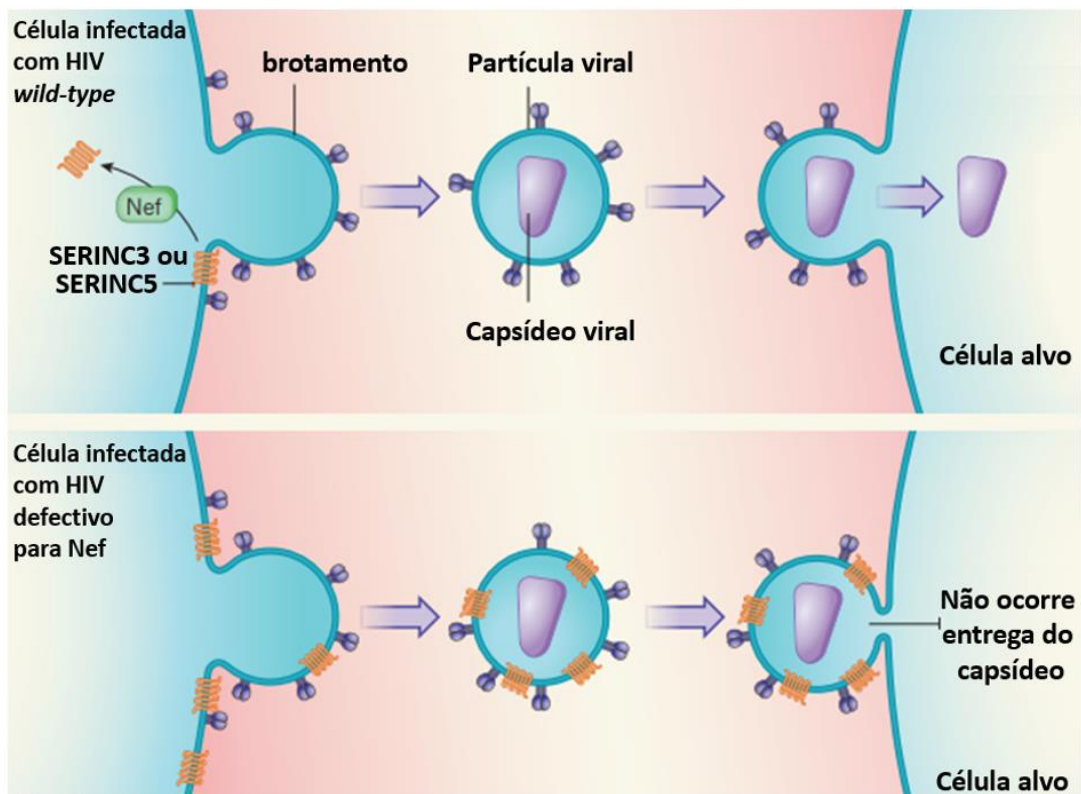


Figura 13. As proteínas SERINC inibem a entrega do capsídeo na célula alvo. Em células infectadas com HIV *wild-type*, Nef remove SERINC da membrana plasmática e o vírus brota sem SERINC na membrana viral. Ao infectar a célula alvo, consegue facilmente fazer a entrega do capsídeo. Em células infectadas com HIV defeitivo para Nef, o vírus brota com proteínas SERINC em sua membrana e apresenta dificuldade na formação do poro de fusão. Conseqüentemente não ocorre a entrega do capsídeo na célula alvo. Modificado de: Aiken, 2015.

A super expressão de SERINC5 não interfere em outras funções de Nef, além de diminuir a infectividade (Trautz et al., 2016). Embora a relação entre Nef e SERINC5, e seus mecanismos ainda sejam pouco conhecidos, Beitari et al. (2017) sugeriram a possível interferência de SERINC5 na função de Env no momento em que o vírus infecta uma nova célula. SERINC5 inibe a formação de pequenos poros de fusão e a entrega do capsídeo viral através de mecanismos que ocorrem antes da abertura do poro. A atuação de SERINC5 consiste em modificar estruturalmente as proteínas Env de cepas sensíveis a esta atividade. A partir desta ação de SERINC5, além da menor eficiência na formação do poro de fusão pelo HIV-1, o mesmo expõe domínios vulneráveis à ação de anticorpos neutralizantes e peptídeos inibitórios que são capazes de reconhecer domínios conservados de gp41. O domínio MPER (região extracelular membrana proximal) de gp41 é alvo de agentes neutralizantes e são transitoriamente expostos durante a fusão viral após uma interferência ocasionada por SERINC5 (Sood et al., 2017).

A isoforma SERINC5-001 possui 461 aminoácidos, é a isoforma mais expressa e a única com atividade anti-HIV-1 dentre as outras quatro isoformas alternativas

(SERINC5-004, -008a, -008b e 005). Uma importante diferença entre as isoformas ocorre na região C-terminal. SERINC5-001 apresenta uma composição com maior número de aminoácidos nesta região, e também um domínio transmembrana adicional chamado de décimo domínio. Este domínio não existe nas outras isoformas (figura 14). O estudo realizado sugere que o décimo domínio é responsável pela localização de SERINC5 na membrana plasmática, e pela estabilização da isoforma com consequente papel em sua expressão e também na atividade de SERINC5 contra HIV-1 (Zhang et al., 2017).

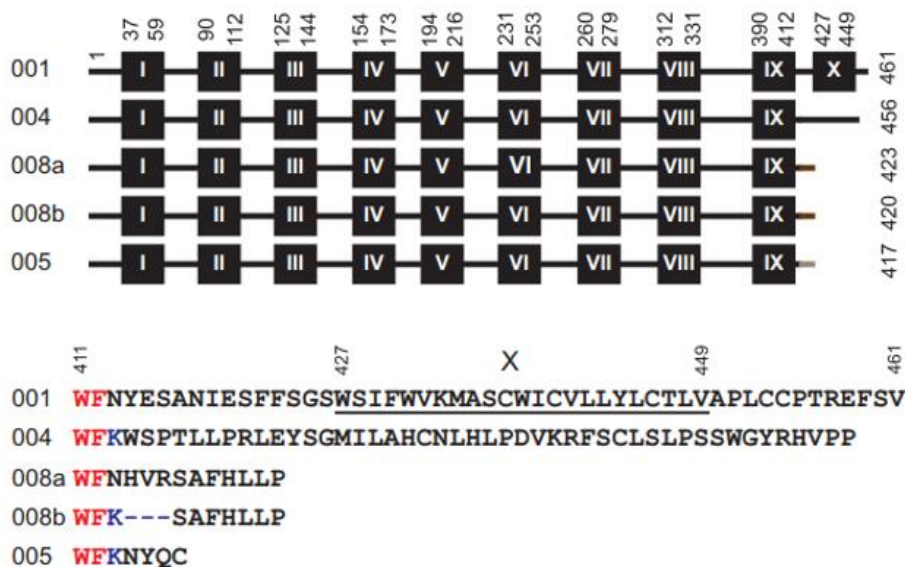


Figura 14. Isoformas de SERINC5. Parte superior: diagrama dos domínios transmembrana preditos para SERINC5. Parte inferior: sequência da região C-terminal das isoformas de SERINC5. A região correspondente ao décimo domínio transmembrana da isoforma 001 está sublinhada. Fonte: Zhang et al., 2017.

1.12. Nef neutraliza a ação de SERINC5 através da via endocítica

Antes da descoberta das proteínas SERINC, Pizzato et al. (2007) demonstraram a importância de clatrina e dinamina 2 no aumento da infectividade de HIV-1 por Nef. A fim de comprovar esta hipótese, o estudo mostrou evidências através de experimentos de interação entre clatrina e dinamina 2, e também com experimentos de depleção da dinamina 2 por siRNA. Logo que as proteínas SERINC foram descobertas como fatores de restrição celular já se relacionou o papel essencial da endocitose e de AP-2 na neutralização de SERINC5 por Nef. A expressão de Nef promove envio de SERINC5 da membrana plasmática para um compartimento endossomal evitando que a molécula seja

incorporada em novos vírions. Confirmando que a ação de Nef contra SERINC5 ocorre na célula produtora de vírus (Usami et al., 2015; Rosa et al., 2015).

Estudos avaliaram a quantidade de SERINC5 presentes na membrana plasmática das células produtoras de vírus e também o efeito de sua ausência na infectividade. A inibição provocada por SERINC5 é dose-dependente, quanto maior a quantidade de SERINC5, menor a infectividade relativa das partículas virais. Porém uma super expressão de SERINC5 é capaz de saturar a ação de Nef (Zhang et al., 2017). Rosa et al. (2015) mostraram que SERINC5 é inibidor da infectividade do HIV-1 através da técnica CRISPR silenciando SERINC5 em linhagem de células T, Jurkat (JTAG).

A primeira evidência da localização de SERINC5 em endossomos indicou sua presença em endossomos tardios Rab7⁺ na presença de Nef (Rosa et al., 2015). Pouco depois, a internalização de SERINC5 por Nef através da endocitose na membrana plasmática foi confirmada. Uma investigação aprofundada sobre o envio de SERINC5 para endossomos mostrou que SERINC5 é encaminhado para os endossomos primários Rab5⁺, tardio Rab7⁺ e de reciclagem Rab11⁺. O aumento da expressão destas três Rabs favorece a regulação negativa de SERINC5. Os resultados de Shi et al. (2018) indicam que a degradação de SERINC5 é via endossomos e MVBs com fim nos lisossomos, e que SERINC5 é enviado para MVBs através de um mecanismo dependente de ubiquitinação (Shi et al., 2018).

A maioria das Rab GTPases humanas, mais de 70, atuam estruturalmente e funcionalmente no tráfego de proteínas. A função de cada uma delas está intimamente ligada com sua localização nos compartimentos celulares, onde coordenam fusão e brotamento de vesículas. As Rabs 5 e 7 foram as primeiras a serem descobertas na via endocítica. As proteínas Rab5 e Rab11 atuam na via endocítica inicial, a primeira está envolvida na biogênese de endossomos primários, e a segunda tem função na via de reciclagem, do endossomo de reciclagem para a membrana plasmática. Rab7 e Rab9 atuam na via endocítica tardia (Wandinger-Ness e Zerial, 2014).

1.13. Fatores que determinam a interação entre Nef e SERINC5

Utilizando o ensaio de complementação bimolecular da fluorescência (BiFC) para a análise de interação proteína-proteína, a interação SERINC5-Nef foi vista em células vivas pela primeira vez por Shi et al. (2018). Neste mesmo experimento, SERINC5 não interagiu com o Nef mutante Nef-G2A, cuja mutação é usada comumente para prevenir

a miristoilação, porção importante para interação com membranas celulares. Este resultado confirmou através de uma estratégia diferente de outras utilizadas em estudos anteriores (Rosa et al., 2015), o fato de que Nef se liga a SERINC5 na face interna da membrana plasmática para removê-lo da membrana e neutralizar sua ação. Uma mutação na região α B hélice localizada no core de Nef impediu a ligação deste mutante com SERINC5, indicando este como um possível local de interação entre as duas proteínas (Shi et al., 2018).

Os fatores determinantes da sensibilidade de SERINC5 à Nef ainda são pouco entendidos. As proteínas SERINC5 de diferentes espécies de vertebrados são capazes de inibir a infectividade de vírions HIV-1 Nef-defectivos, e a conservação desta atividade anti-HIV provavelmente relaciona-se com a função biológica de SERINC5. Proteínas SERINC5 ortólogas de humano, rã, camundongo e zebrafish inibem de maneira semelhante, e fortemente (de 40 a 50 vezes), a infectividade de vírions produzidos em células 293T na ausência de Nef (HIV-1 Nef⁻). Porém, quando nas células produtoras de vírus, Nef_{sf2} (um alelo da proteína Nef de HIV-1) é expresso *in trans*, a infectividade viral aumenta somente nas células que expressam SERINC5 humano e SERINC5 de camundongo, proteínas que se mostram sensíveis à Nef. Nas células que expressam SERINC5 de rã ou de zebrafish, o aumento da infectividade de HIV-1 não é reestabelecido com a expressão de Nef_{sf2}, indicando que essas proteínas são resistentes a Nef (Dai et al., 2018).

O SERINC5 de humano, que é sensível a Nef, mostra-se resistente quando tem a maior alça citoplasmática interna (loop citoplasmático interno 4- ICL4) trocada pela ICL4 de um SERINC5 resistente a Nef. Dentro da sequência de ICL4 de SERINC5 humano, os aminoácidos hidrofóbicos, leucina e isoleucina (respectivamente os aminoácidos número 350 e 353, figura 15), são importantes para conferir sensibilidade a Nef. Portanto, mesmo na presença de Nef, moléculas de SERINC5 modificadas nessas regiões poderiam restringir a infectividade de HIV-1. Ou seja, a atividade anti-HIV de SERINC5 humano poderia persistir na presença de Nef, o que significa uma nova estratégia de combate ao HIV. A região interna de ICL4 é flexível e o mecanismo de seleção conformacional pode estar envolvido na sua interação com a proteína Nef (Dai et al., 2018).

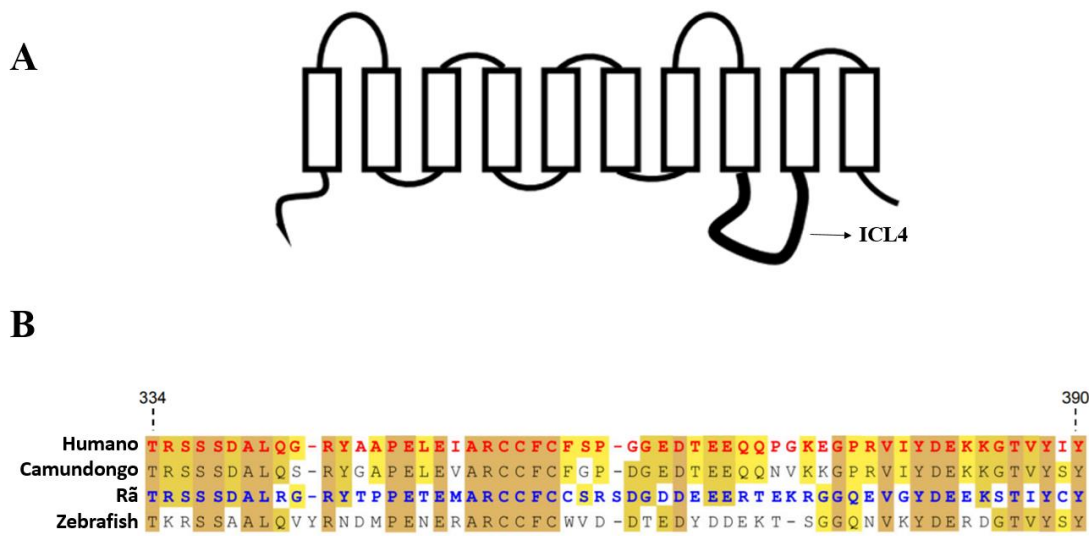


Figura 15. O loop citoplasmático longo de SERINC5 humano é sensível à atividade de Nef. A. O loop intracelular 4 (ICL4) de SERINC5 humano. B. Alinhamento de regiões ICL4 de SERINC5 humano (*Homo sapiens*), de camundongo (*Mus musculus*), de rã (*Xenopus tropicalis*), e de zebrafish (*Danio rerio*). As proteínas SERINC5 das duas primeiras espécies são sensíveis a Nef (humano e camundongo), e das demais são resistentes a Nef (rã e zebrafish). Modificado de: Dai et al., 2018.

Após a descoberta da relação entre as proteínas SERINC5 e Nef com o aumento ou diminuição da infectividade do HIV-1 em 2015, muitas pesquisas foram publicadas no decorrer dos últimos três anos com o objetivo de melhor compreender esta relação. Porém sabe-se muito pouco a respeito de como Nef é capaz de alterar a localização de SERINC5 através do transporte intracelular de proteínas. Devido a este fato e também à importância do vírus HIV-1 e da AIDS na atualidade, são necessárias investigações sobre os mecanismos moleculares que regulam o tráfego intracelular de SERINC5 influenciado por Nef de HIV-1.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na regulação do tráfego intracelular de SERINC5 influenciado por Nef de HIV-1.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Investigar a localização subcelular de SERINC5 na presença e na ausência de Nef.

2.2.2. Identificar componentes da maquinaria de tráfego intracelular utilizados por Nef de HIV-1 para neutralizar a ação de SERINC5.

2.2.3. Avaliar a importância de AP-1 na regulação negativa de SERINC5 por Nef de HIV-1.

2.2.4. Investigar o envolvimento da maquinaria ESCRT na regulação negativa de SERINC5 por Nef.

2.2.5. Caracterizar a rota de transporte intracelular pela qual SERINC5 é redirecionada sob o efeito de Nef.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1. Linhagens Celulares

Células HeLa-CCL2 e HEK293T do ATCC (American Type Culture Collection – Manassa, VA, EUA) foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Invitrogen - Carisbad, CA, EUA) e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Invitrogen, Carisbad, CA, EUA), 100 U/mL de penicilina (Gibco, Invitrogen, Carisbad, CA, EUA), 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Invitrogen, Carisbad, CA, EUA), e 3,7 g/L de NaHCO₃ (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO).

As células A3.01 foram incubadas com o sobrenadante contendo os vírus IRES-GFP ou NEF-IRES-GFP por 24 horas. Em seguida, as células transduzidas foram lavadas (PBS) e cultivadas por 72 horas. Células positivas para GFP foram separadas por citometria de fluxo. Células A3.01 expressando GFP (A3.01 GFP) ou Nef e GFP (A3.01 Nef/GFP) foram expandidas em cultura com meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI - Life Technologies, Carlsbad, CA) suplementado como descrito acima.

As células foram cultivadas em estufa úmida com 5% de CO₂, a 37°C. O subcultivo celular foi realizado utilizando Tripsina-EDTA (Invitrogen, Gibco, Grand Island, NY, EUA) para soltar as células, seguido de centrifugação a 100xg por 5 minutos e replaqueamento.

3.2. Plasmídeos de Expressão

O plasmídeo pcDNA-SERINC5-HA que codifica o SERINC5 humano foi gentilmente cedido pela Dra. Luciana Jesus da Costa (Instituto de Microbiologia, UFRJ) e descrito em Rosa et al. (2015) (figura 16). O plasmídeo pNefWT.IRES.GFP codificando Nef de HIV-1 (variante NL4-3) foi previamente descrito em Chaudhuri et al. (2007) e daSilva et al. (2009).

Os plasmídeos peGFP-VPS4-wt e peGFP-VPS4-E/Q (onde VPS4-E/Q se refere a VPS4 com a mutação E223Q que inativa a atividade de ATPase) foram cedidos por Philip Woodman (University of Manchester, United Kingdom). O plasmídeo pHRS-eGFP foi obtido a partir da amplificação do cDNA do fragmento codificante para HRS (amplificado do pCIneo3xHA-HRS (Amorim et al., 2014) e clonado no vetor peGFP-C (Clontech) (daSilva et al., 2009).

Para os experimentos de complementação bimolecular de fluorescência (BiFC), o plasmídeo pcDNA3.1/ Zeo (Invitrogen) codificando separadamente as metades N- e C-terminal da proteína fluorescente Venus (VNt, resíduos 1–158, e VCt, resíduos 159–239, respectivamente), fusionadas a uma sequência de fator de transcrição zipper de leucina, foram fornecidos por Jurgen Miller (Universidade de Warwick, Coventry, UK). As sequências zipper de leucina nesses vetores foram substituídas pela sequência completa de Nef (NL4-3) ou μ 1A para obter pNef-VNt (Amorim et al., 2014) e pVCt- μ 1A (Tavares et al., 2016).

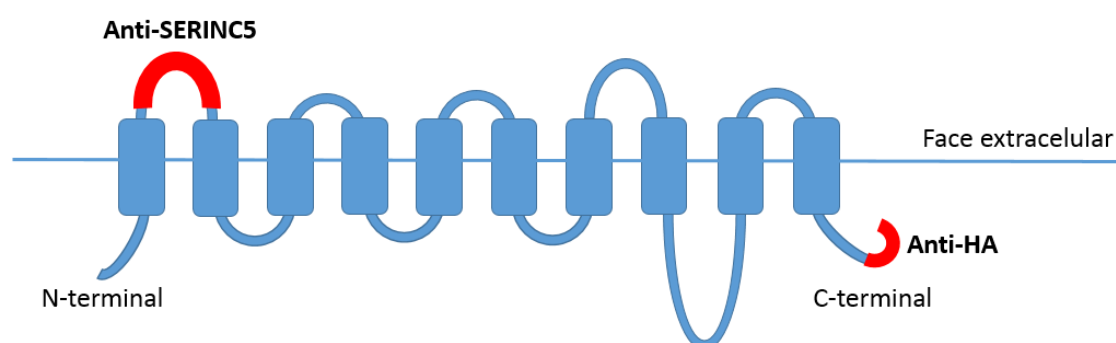


Figura 16. Regiões de SERINC5-HA reconhecidas pelos anticorpos anti-SERINC5 e anti-HA. O plasmídeo pcDNA-SERINC5-HA codifica o SERINC5 humano com uma *tag* HA voltada para a face intracelular na região C-terminal que é reconhecida pelo anti-HA (Sigma-Aldrich, monoclonal produzido em camundongo; ou Thermo Scientific, monoclonal produzido em coelho). A alça externa de SERINC5 destacada em vermelho é reconhecida pelo anti-SERINC5 (Sigma-Aldrich, monoclonal produzido em coelho).

O plasmídeo μ 1A-VCt foi construído da seguinte maneira: a fase aberta de leitura (ORF) do μ 1A foi amplificada por PCR a partir do plasmídeo pCIneo μ 1A-HA (Guo et al., 2013) utilizando-se oligonucleotídeos específicos. A região amplificada foi usada para substituir a sequência zipper de leucina (LZ) no plasmídeo pcDNA3.1/Zeo-LZ-VCt (MacDonald et al., 2006). O que resultou em μ 1A C-terminal ligado a uma sequência de espaçamento (GGGSGGGGSSG), seguido pela sequência de VCt (resíduos de 159 a 239 da proteína Venus) (Tavares et al., 2016).

O plasmídeo pVNt-Alix foi gerado a partir da retirada do cDNA de Alix do plasmídeo pcDNA3.1/Zeo-Alix-VCt (Amorim et al., 2014) que foi utilizado para substituir a sequência zipper de leucina no pcDNA3.1/Zeo-VNt-LZ (MacDonald et al., 2006). O resultado foi uma sequência de VNt sequence (resíduos de 1 a 158 da proteína Venus) ligado a uma sequência espaçadora (GGGSGGGGSSG), seguido de Alix.

Os plasmídeos provirais de HIV-1 NL4-3 WT e o mesmo deletado para Nef, HIV-1 NL4-3 Δ Nef (Adachi et al., 2001), foram obtidos através do Programa de Reagentes do

NIH AIDS, e cedidos pela Dra. Luciana Jesus da Costa (Instituto de Microbiologia, UFRJ).

A tabela a seguir resume as informações dos plasmídeos utilizados:

Plasmídeo	Região codificadora	Referência
pcDNA3.1	SERINC5-HA	Rosa et al., 2015
pIRES2-eGFP-Nef	NL4-3 Nef WT / eGFP	Chaudhuri et al., 2007
pIRES2-eGFP	eGFP	Clontech, Mountain View, CA
peGFP	VPS4-WT	daSilva et al., 2009
peGFP	VPS4-E/Q	daSilva et al., 2009
peGFP	HRS	daSilva et al., 2009
pcDNA3.1/ Zeo	Nef-VNt	Amorim et al., 2014
pcDNA3.1/ Zeo	VCt- μ 1A	Tavares et al., 2016
pcDNA3.1/ Zeo	VCt-Alix	Amorim et al., 2014
pcDNA3.1/ Zeo	Alix-VNt	—
pNL4-3 WT	HIV-1 NL4-3 WT	Adachi et al., 2001
pNL4.3 Δ Nef	HIV-1 NL4-3 Δ Nef	Adachi et al., 2001
pCIneo	NL4-3 Nef-wt	Lindwasser et al., 2008

3.3. Preparações de DNA plasmideal

Bactérias da cepa de *Escherichia coli* DH5 α (Woodcock et al., 1989) foram transformadas por choque térmico e utilizadas para multiplicar os plasmídeos. O DNA plasmideal (1 μ l) e a bactéria (50-100 μ l) foram incubados por 15 minutos no gelo seguido de 3 minutos a 37°C. Posteriormente, as bactérias transformadas foram incubadas em 1ml de meio LB (Luria Bertani) (Acumedia, Neogen Corporation, Lansing, MI, EUA) por 40 minutos à 37°C sob agitação. As bactérias foram estriadas em placas com LB sólido suplementado com o antibiótico apropriado, e crescidas a 37°C para o isolamento de colônias. No dia seguinte, colônias isoladas foram utilizadas para produção de pré-inóculos que foram destinados a preparações de DNA plasmideal utilizando o kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, EUA) ou o kit PureYield Plasmid Maxipreps System (Promega, Madison, WI, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

3.4. Anticorpos

Os anticorpos utilizados nesse estudo e seus respectivos fabricantes estão descritos nas tabelas abaixo de acordo com a técnica em que foram empregados.

> Citometria de Fluxo:

Anticorpo	Fabricante
SERINC5	Sigma-Aldrich
F(ab') ₂ anti-IgG de coelho alexa-647	Thermo Scientific

> Western Blot:

Anticorpo	Fabricante
γ 1-adaptina	BD Biosciences
SERINC5	Sigma-Aldrich
P24	NIH AIDS Reagent Program
β -actina	Thermo Scientific
HA	Thermo Scientific
anti-IgG de camundongo HRP	GE Healthcare
anti-IgG de coelho HRP	GE Healthcare

> Imunofluorescência:

Anticorpo	Fabricante
γ 1-adaptina	BD Biosciences
Nef	NIH AIDS Reagent Program
HÁ	Thermo Scientific
HA	Sigma-Aldrich
Giantina	Covance Research Products
TGN46	AbD Serotec
anti-IgG de camundongo Alexa 647	Life Technologies
anti-IgG de coelho Alexa 647	Life Technologies
anti-IgG de ovelha Alexa 647	Life Technologies
anti-IgG de coelho Alexa 594	Life Technologies

3.5. Transfecções

As células HeLa-CCL2 e HEK293T foram contadas e cultivadas em placas com meio de cultura DMEM contendo 10% de SFB, por aproximadamente 16 horas, até atingirem de 70 a 90% de confluência no momento da transfecção. O reagente Lipofectamina 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA) foi diluído em meio Opti-MEM, assim como os plasmídeos indicados em cada experimento, seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, o DNA foi adicionado à lipofectamina na proporção de 1:1 e incubados por quinze minutos à temperatura ambiente. Em seguida o mix contendo os complexos DNA-lipossomos foram adicionados nas placas contendo células. Após a transfecção, as células foram novamente incubadas em estufa por 24 horas a 37°C e 5% CO₂.

3.6. Silenciamento induzido por siRNA (*small interfering RNA*)

Primeiramente as células HeLa-CCL2 foram cultivadas em placas de 24 poços, após 24h e ao atingir em média 70-90% de confluência as células foram tratadas com siRNA para $\gamma 1$ a fim de diminuir os níveis endógenos desta subunidade do complexo AP-1. No terceiro dia de experimento as células foram tripsinizadas e replaqueadas em placas de 24 poços com lamínulas para no quarto dia atingir a confluência de 50%. No quarto dia de experimento as células foram novamente tratadas com siRNA. No quinto dia do experimento os plasmídeos codificando Nef-WT ou o plasmídeo vazio correspondente (controle) foram transfectados junto com o SERINC5-HA, conforme descrito nas legendas das figuras.

Após a dupla transfecção as células foram armazenadas na estufa por 24h e fixadas no sexto dia com paraformaldeído 4% como indicado na técnica de imunofluorescência indireta (figura 17) (Lubben et al., 2007; Motley et al., 2003). A transfecção do siRNA foi feita utilizando-se o reagente Oligofectamina (Thermo Fisher Scientific). Foi utilizado scramble siRNA (Sigma Aldrich) como controle negativo do experimento. O siRNA para $\gamma 1$ -adaptina (Dharmacon, Lafayette, CO) tem as seguintes sequências:

- S: GGAAGAGCCUAUUCAGGUAdtdt - AS: UACCUGAAUAGGCUCUUCdtd

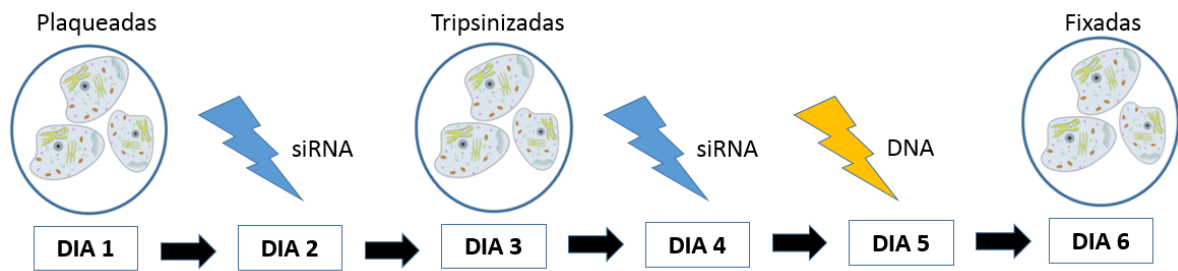


Figura 17. Sequência de procedimentos para silenciamento de $\gamma 1$ -adaptina (subunidade do complexo AP1) induzido por siRNA em células HeLa CCL2. As células são plaqueadas e transfectadas com siRNA no dia seguinte, no terceiro dia é realizada a tripsinização e no quarto dia uma nova transfecção de siRNA. No quinto dia o DNA de interesse é transfectado e no sexto dia as células são fixadas.

3.7. Tratamento de células com drogas

Células HeLa-CCL2 foram crescidas em lamínulas e transfectadas com os plasmídeos pcDNA-SERINC5-HA juntamente com pIRES-GFP-NefWT e então tratadas com 5mg/ml de Brefeldina A (Sigma-Aldrich) nos tempos de 15, 30 e 45 minutos a 37°C. As células controle não foram tratadas com a droga. Após os tempos citados acima, as células foram preparadas de acordo com a técnica de imunofluorescência. As células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpos específicos para HA, TGN46 ou giantina.

Células HEK293T foram tratadas com NH_4Cl (50Mm) ou MG132 (1 μM) e incubadas por 6 horas. Após este período foram coletadas para ensaio de *western blotting*.

3.8. Ensaio de Complementação bimolecular da fluorescência (BiFC)

BiFC é uma técnica usada para o estudo de interações proteína-proteína através de microscopia confocal. Este ensaio permite a identificação de duas proteínas após a reconstituição do fluoróforo Venus (Dirk et al., 2015; Kerppola, 2008) (figura 18). Células HeLa foram co-transfectadas com pcDNA-SERINC5-HA e constructos codificantes para Nef e $\mu 1A$ (subunidade de AP-1) fusionado ao N- ou C-terminal da proteína fluorescente Venus, respectivamente (Nef-VNt e VCt- $\mu 1A$). Em outro experimento, células HeLa foram co-transfectadas com pcDNA-SERINC5-HA, Alix-VNt e VCt-Alix. Após 8h da transfecção as células foram fixadas e preparadas para imunofluorescência.

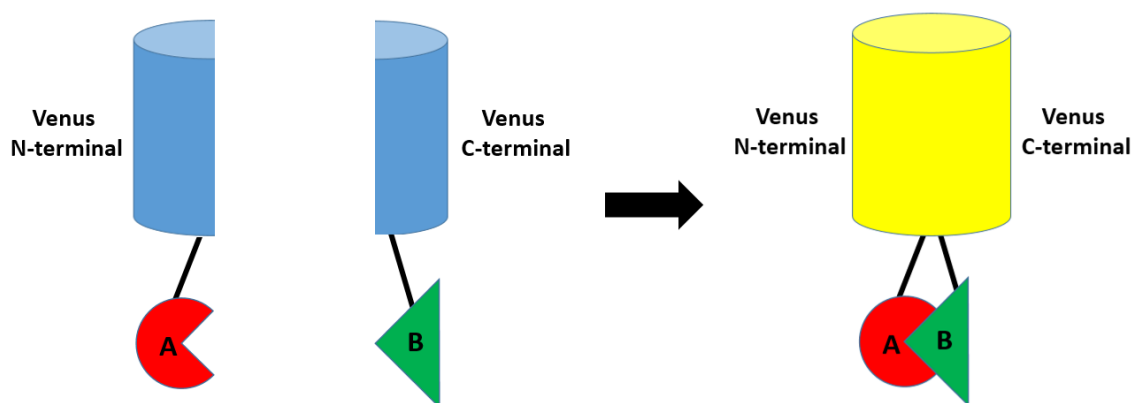


Figura 18. Esquema do ensaio bimolecular de complementação da fluorescência (BiFC). No ensaio de interação BiFC as proteínas são fusionadas à porção N- ou C-terminal da proteína fluorescente Vênus, caso ocorra interação entre as duas proteínas o fluoróforo é reconstituído. A localização da interação pode ser visualizada por imunofluorescência.

3.9. Imunofluorescência e Microscopia confocal

Células HeLa foram crescidas com DMEM suplementado com 10% de SFB em placas de 24 poços com lamínulas de vidro, e transfectadas no dia seguinte com os plasmídeos indicados nas legendas das figuras. Após 24h as células foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS) para retirada do meio de cultura e fixadas com 4% de paraformaldeído (PFA) em PBS por 15 minutos a temperatura ambiente. As células foram lavadas 3 vezes com PBS para retirada da solução fixadora e então permeabilizadas com 0,01% de saponina em solução de bloqueio (0,2% de gelatina porcina em PBS) por 15 minutos a 37°C.

Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo primário de interesse por 30 minutos a 37°C. As células foram lavadas com PBS e as lamínulas incubadas com o anticorpo secundário correspondente por 30 minutos a 37°C. As lamínulas foram lavadas com PBS e colocadas em lâminas com o meio de montagem Fluoromount-G (Electron Microscopy Sciences).

As imagens foram feitas no microscópio confocal *Zeiss confocal laser scanning microscope* (LSM) 780 (Zeiss, Jena, Germany) do Laboratório Multiusuário de Microscopia Multiphoton da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). As imagens adquiridas foram processadas com o auxílio do software ImageJ 1.36 (Abràmoff et al., 2004; Schneider et al., 2012). As análises de colocalização foram feitas com conjuntos de imagens das mesmas células (Z-stack, com 0,38 µm de intervalo) para cada marcador. O cálculo do coeficiente de Manders para cada canal foi feito com o ImageJ.

O coeficiente de Manders varia de 0 a 1, correspondendo a nenhuma sobreposição ou completa sobreposição de sinais, respectivamente. O “score” e “threshold” para ambos os canais foram calculados automaticamente de acordo com algoritmo de Costes et al. (2004).

3.10. Análise Estatística

Os dados de colocalização obtidos no experimento de imunofluorescência foram analisados usando o programa GraphPad Prism 5.0. A significância estatística foi calculada pelo teste One Way ANOVA seguido de pós teste de múltipla comparação de Bonferroni. Diferenças foram consideradas significantes para valor de $p < 0.05$.

3.11. SDS-PAGE e *Western blotting*

Células aderentes a serem analisadas por *western blotting* foram lavadas com PBS e soltas com PBS-EDTA 2mM. A lise das células foi realizada adicionando tampão de lise (50 mM Tris-HCl [pH 7,5], NaCl 150 mM, 10% [vol/vol] de glicerol, 5 mM de EDTA, 1% [vol/vol] de Triton X-100) contendo inibidor de protease (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) e incubando as amostras por 30 minutos a 4°C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 20 minutos.

A quantidade de proteínas totais do sobrenadante foi equalizada utilizando o reagente Protein Assay da BioRAD (Hercules, CA). Em seguida, adicionou-se o tampão de carregamento, que consiste em tampão de amostra (azul de bromofenol 0,1%, EDTA 5mM, Tris-HCl (pH 8,8) 200mM, Sucrose 1M) suplementado com SDS10% e DTT 1M. As amostras em tampão de carregamento foram sonicadas por 10 segundos e mantidas em gelo. Após este preparo, as amostras foram carregadas em gel de poliacrilamida 12% ao lado de um marcador de peso molecular (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) para separação proteica por eletroforese.

A corrida foi realizada com voltagem constante de 90 volts em tampão de corrida composto por 25mM de Trizma® base (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 190 mM de glicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 0,1% de SDS. Após a eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose 0,45 µm (Amersham Biosciences, GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, EUA). A eletrotransferência

foi realizada a 360 mA por 1 hora em tampão de transferência (25mM Trizma® base, 190mM Glicina em 10% v/v de Metanol).

As membranas foram coradas com solução de 0,1% v/v de Ponceau S (SigmaAldrich, St.Louis, MO, EUA) em 5% de ácido acético para verificação da eficiência da transferência. As membranas foram lavadas com solução de PBS-T (PBS suplementado com 0,1% de Tween 20, SigmaAldrich, St. Louis, MO, EUA) até completa remoção do corante Ponceau. Em seguida, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado em PBS-T) por 1 hora sob agitação constante. Após este período, as membranas foram lavadas novamente com PBS-T, e finalmente incubadas com os anticorpos primários de interesse overnight a 4°C, sob agitação. Os anticorpos foram diluídos em PBS com 1% de BSA.

No dia seguinte, o anticorpo primário foi retirado e as membranas foram lavadas com PBS-T. Em seguida, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpos secundários conjugados a HRP, diluídos em solução de bloqueio. As membranas foram lavadas com PBS-T e a detecção de proteínas foi feita após adição da solução de ECL [0,1M de Tris-HCl pH 8,5, 1,25mM de Luminol (SigmaAldrich, St. Louis, MO, EUA), 0,2mM de ácido cumárico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 0,02% de H₂O₂].

O equipamento utilizado para captação do sinal de luminescência foi o ChemicDoc (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA), e as imagens foram processadas no software Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA).

3.12. Citometria de Fluxo

As células foram lavadas com PBS e incubadas em solução de bloqueio (PBS + 1% BSA) por 1 hora. Em seguida as células foram centrifugadas, ressuspensas e incubadas em anticorpo primário anti-SERINC5 diluído em solução de bloqueio (1:100). As células foram lavadas três vezes com solução de bloqueio e incubadas com anticorpo secundário F(ab')₂ anti-IgG coelho conjugado a Alexa-647 por 1 hora.

Após a marcação com anticorpos primário e secundário, as células foram lavadas com solução de bloqueio e fixadas com formaldeído 1% diluído em PBA. As células não foram permeabilizadas para permitir a análise apenas de SERINC5 presente na membrana plasmática. Células expressando Nef pela transfecção de pIRES-GFP-Nef foram selecionadas pela fluorescência de GFP. Por fim, a aquisição dos resultados foi realizada utilizando o aparelho FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA) disponível no

laboratório Multiusuário do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP-USP, e analisadas utilizando o programa FlowJo.

3.13. Produção de vírus

Partículas HIV-1 *wild type* (WT) e HIV-1 Nef-defectivo (Δ Nef) foram produzidas a partir da transfecção dos plasmídeos provirais em células HEK-293T. Os vírus foram produzidos na ausência ou presença de SERINC5-HA, a partir da co-transfecção com o plasmídeo de expressão pCDNA-SERINC5-HA. As células foram transfectadas e incubadas em condições normais de cultura por 48h em estufa do laboratório de nível de biossegurança 3 (BSL-3) no Centro de Pesquisa em Virologia da FMRP-USP. Após 48h o sobrenadante foi coletado, filtrado em seringa para remoção de debris celulares, e preparado para ultracentrifugação em colchão de sacarose 20%. As amostras foram centrifugadas a 29000 rpm por 1 hora e 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* dissolvido em tampão de carregamento para *western blotting*.

As células HEK-293T produtoras de vírus também foram analisadas por *western blotting*. Após 48h de incubação para produção das partículas virais, as células foram lavadas com PBS, e soltas da placa com solução de PBS-EDTA 2mM. Em seguida as células foram lisadas com tampão de lise adicionado de inibidor de protease e centrifugadas para remoção dos debris a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C. Ao lisado foi adicionado em tampão de carregamento na proporção 1:1 (volume : volume).

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Nef induz redistribuição de SERINC5 da membrana plasmática para região justanuclear

A proteína acessória Nef de HIV-1, cujo gene viral é transcrito mais abundantemente durante os estágios iniciais da infecção, desempenha muitos papéis na patogênese do HIV-1. Nef aumenta a replicação e a infecciosidade (ou infectividade) do vírus, sendo assim determinante para a progressão da doença. Adicionalmente, Nef subverte a maquinaria de tráfego de proteínas para robustamente regular negativamente certas moléculas da superfície celular, como por exemplo CD4 e MHC-I, que são cruciais no sistema de imunidade do hospedeiro e no ciclo de replicação viral (Janvier et al., 2003; Matheson et al., 2015; Murrell et al., 2016).

O fato de que Nef é capaz de aumentar a infectividade de novas partículas virais permaneceu sem muita explicação ao longo do tempo. Recentemente, duas publicações independentes, Rosa et al. (2015) e Usami et al. (2015), investigaram os mecanismos moleculares que poderiam explicar esta atividade de Nef. Estes estudos demonstram que Nef é capaz de remover duas proteínas da membrana plasmática da célula hospedeira, SERINC3 e SERINC5, prevenindo a incorporação dessas proteínas em novas partículas virais.

A presença de SERINC3 e SERINC5 em vírions HIV-1 pode inibir a expansão do poro de fusão quando o vírus tenta infectar uma nova célula. Conseqüentemente, a capacidade da entrega do material genético viral no citoplasma das células alvo é reduzida. Portanto, pesquisadores da área têm sugerido que SERINC3/SERINC5 são moléculas inibitórias da infectividade de HIV-1, e portanto, fatores anti-retrovirais celulares. Neste contexto, AP-2 é requerido para o antagonismo de SERINC5 mediado por Nef. SERINC5 é endocitado e redistribuído para um compartimento intracelular na presença de Nef e, conseqüentemente, excluído da incorporação em novos vírions (Rosa et al., 2015; Usami et al., 2015; Trautz et al., 2016; Beitari et al., 2017; Zhang et al., 2017; Shi et al., 2018). Desta forma, o objetivo deste trabalho é elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na regulação do tráfego intracelular de SERINC5 influenciado por Nef de HIV-1.

Considerando a evidência que Nef redistribui SERINC5 da superfície celular para compartimentos intracelulares em linfócitos (Rosa et al., 2015), o ensaio de

imunofluorescência indireta foi utilizado para confirmar este dado. Além disso, testar se o mesmo efeito ocorre em células HeLa CCL-2 que é uma linhagem de fácil estabelecimento em cultura e ideal para transfecção de plasmídeos de expressão e RNAi. A análise da microscopia de imunofluorescência mostrou que quando o plasmídeo controle (pIRES-GFP) é transfectado, juntamente com o plasmídeo que codifica a proteína SERINC5 fusionada ao HA (pcDNA-SERINC5-HA), após vinte e quatro horas de transfecção, SERINC5 se encontra na superfície de células HeLa CCL-2 (figura 19 A-B), provavelmente representando a membrana plasmática. Entretanto, na presença de Nef, quando co-transfectamos pIRES-GFP-Nef e pcDNA-SERINC5-HA, SERINC5 apresenta-se acumulado na região justanuclear (figura 19 C-D).

As células foram marcadas com anticorpo anti-HA para identificação da proteína SERINC5 (figura 16). A quantidade de DNA transfectado nos experimentos de imunofluorescência foi sempre a mesma, seguindo a proporção de 1µg de SERINC5 para 4µg de Nef em placa de 24 poços, com Nef em excesso como sugerido em Rosa et al. (2015). Nesta proporção, conseguimos observar um efeito mais claro e robusto da ação de Nef sobre SERINC5. Além disso, o plasmídeo de expressão escolhido para expressar Nef foi o plasmídeo IRES que também expressa GFP, desta forma as células que expressam Nef são facilmente identificadas pela fluorescência de GFP.

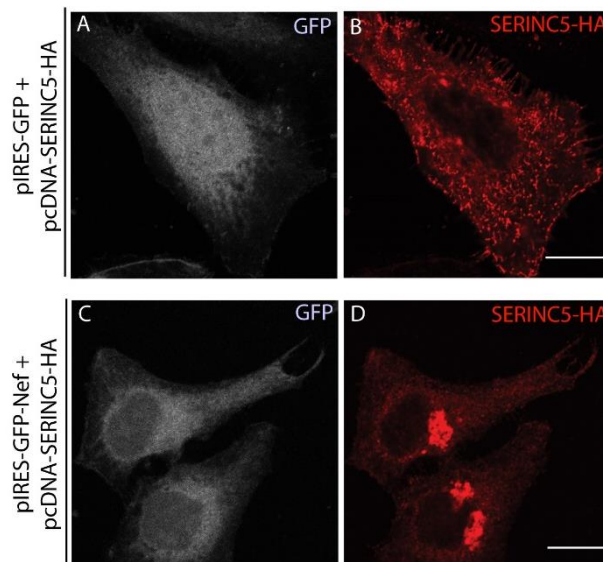


Figura 19. Nef altera a distribuição de SERINC5 em células HeLa CCL-2. Células HeLa CCL-2 foram crescidas em lamínulas e co-transfectadas na condição controle com pcDNA-SERINC5-HA e plasmídeo pIRES-GFP (figura 19 A-B). Na condição experimental o plasmídeo pcDNA-SERINC5-HA foi co-transfectado com o plasmídeo codificando a proteína Nef (pIRES-GFP-Nef) (figura 19 C-D). As células foram fixadas, permeabilizadas e imunomarcadas para HA (anti-HA camundongo), epítipo utilizado para identificação da proteína SERINC5. As imagens foram capturadas em microscópio confocal *Zeiss confocal laser scanning microscope* (LSM) 780 e processadas no programa Image J 1.36. Barra de escala, 10 µm.

4.2. SERINC5 encontra-se na região do Golgi na presença de Nef

Como apresentado no item anterior, o acúmulo de SERINC5 foi observado na região justanuclear das células HeLa CCL-2 expressando Nef. A fim de elucidar o compartimento celular no qual SERINC5 se encontra, foram testados marcadores do Golgi por imunofluorescência em células expressando Nef e SERINC5. Quando as células foram co-transfectadas com SERINC5-HA e o plasmídeo IRES-GFP, SERINC5 está localizado principalmente na periferia da célula (figura 20 A-H). Em células expressando Nef, aproximadamente 65% do SERINC5 co-localiza com TGN46 (tabela 1), molécula residente na região trans-Golgi (figura 20 I-L). Nestas células, SERINC5 também co-localiza com Giantina, marcador de cis-Golgi (~73%, tabela 1; figura 20 M-P). Portanto, SERINC5 mostrou alta co-localização com marcadores de Golgi na presença de Nef.

Após a observação de que SERINC5 co-localiza com marcadores do complexo de Golgi e TGN em células expressando Nef, a relação deste fenótipo com a atividade da GTPase ARF 1 (*ADP-ribosylation fator*) foi testada através do tratamento das células com Brefeldina A (BFA). A BFA inibe a ativação de ARF1, ou seja, sua mudança para o estado ativado ARF1-GTP. O principal papel de ARF1 é recrutar efetores, como AP-1, que auxiliam no transporte vesicular entre TGN e endossomos (revisado na introdução, item 1.9) (Stamnes e Rothman, 1993).

Em células transfectadas com pIRES-GFP-Nef e pcDNA-SERINC5-HA, SERINC5 co-localiza extensivamente com Giantina após vinte e quatro horas de transfecção (figura 21 A-D). Em células transfectadas nestas mesmas condições e tratadas com 5 mg/ml de BFA a 37°C por 15 minutos, é possível observar que SERINC5 começa a se “dissociar” da região justanuclear assim como a Giantina (figura 21 E-H). Após 30 minutos (figura 21 I-L) ou 45 minutos (figura 21 M-P) do tratamento com BFA, o complexo de Golgi começou a desmantelar como descrito em Wyrozumska et al. (2014), e estruturas positivas para SERINC5 e Giantina apresentaram uma gradual dispersão pelo citoplasma.

Os resultados obtidos mostraram que a associação de SERINC5 à região justanuclear, na presença de Nef, é dependente de ARF-GEF. Além de ser uma evidencia adicional de que Nef promove a acumulação de SERINC5 no complexo de Golgi. Rosa et al. (2015) e Shi et al. (2018) também observaram o acúmulo perinuclear de SERINC5 na presença de Nef mas não investigaram a sua realocação para o complexo de Golgi.

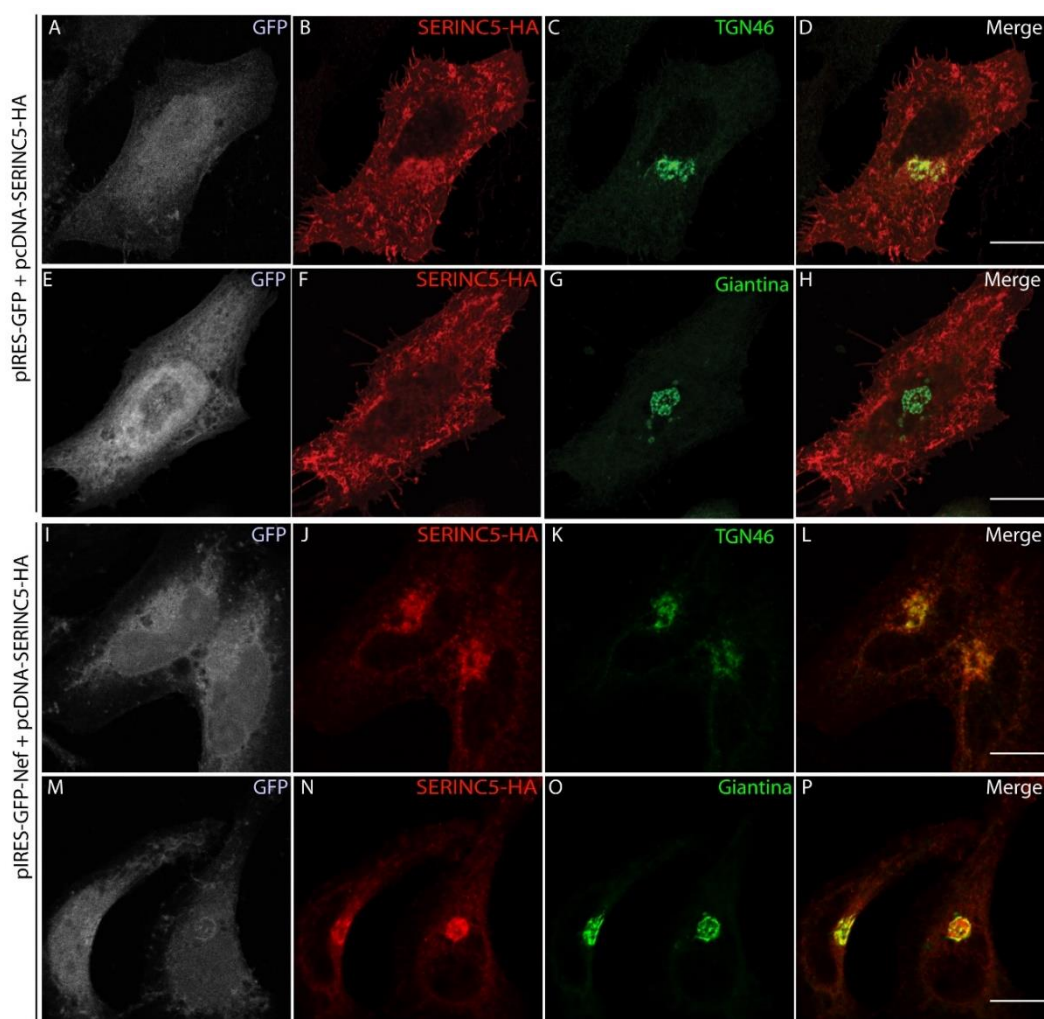


Figura 20. Co-localização de SERINC5 com marcadores do Golgi em células HeLa CCL-2. Células HeLa foram transfectadas com os plasmídeos pcDNA-SERINC5-HA e pIRES-GFP (ausência de Nef, 20 A-H); ou com pcDNA-SERINC5-HA e pIRES-GFP-NEF (presença de Nef, 20 I-P). As células foram fixadas com paraformaldeído 4%, imunomarcadas para HA e para o Golgi com TGN46 (20 A-D e 20 I-L) ou Giantina (20 E-H e 20 M-P). As imagens foram capturadas em microscópio confocal *Zeiss confocal laser scanning microscope* (LSM) 780 e processadas no programa Image J 1.36. Barra de escala, 10 μ m.

Coeficiente de Manders (*Threshold*)

Proteínas	tM1	tM2
SERINC5-HA e TGN46	$0,65 \pm 0,02$ N=5	$0,76 \pm 0,05$ n=5
SERINC5-HA e Giantina	$0,73 \pm 0,05$ n=5	$0,85 \pm 0,04$ n=5

Tabela 1. Análise quantitativa da co-localização entre sinais de SERINC5 e marcadores do Golgi (TGN46 e Giantina) na presença de Nef. A quantificação da co-localização foi calculada com o *plugin Colocalization Threshold* do programa Image J. O coeficiente de Manders (M) foi determinado aplicando o *threshold* (tM) e calculado automaticamente através do algoritmo de Costes et al. (2004). O coeficiente de Manders pode variar entre 0 e 1, correspondendo a não co-localização e co-localização total, respectivamente. O coeficiente de co-localização de Mander tM1, é definido como a intensidade total de pixels do canal 1 (594) que se sobrepõe ao canal 2 (647), relativo ao total da intensidade do canal 1. O coeficiente tM2 é definido como a intensidade total de pixels do canal 2 (647) que se sobrepõe ao canal 1 (594), relativo ao total de intensidade do canal 2. A tabela mostra a média \pm o desvio padrão do coeficiente de Manders indicando a sobreposição entre o sinal de SERINC5 e proteínas residentes no cis-Golgi (Giantina) e trans-Golgi (TGN46). Os dados foram obtidos de uma série com cortes em Z (com intervalos de 0,3 μ m).

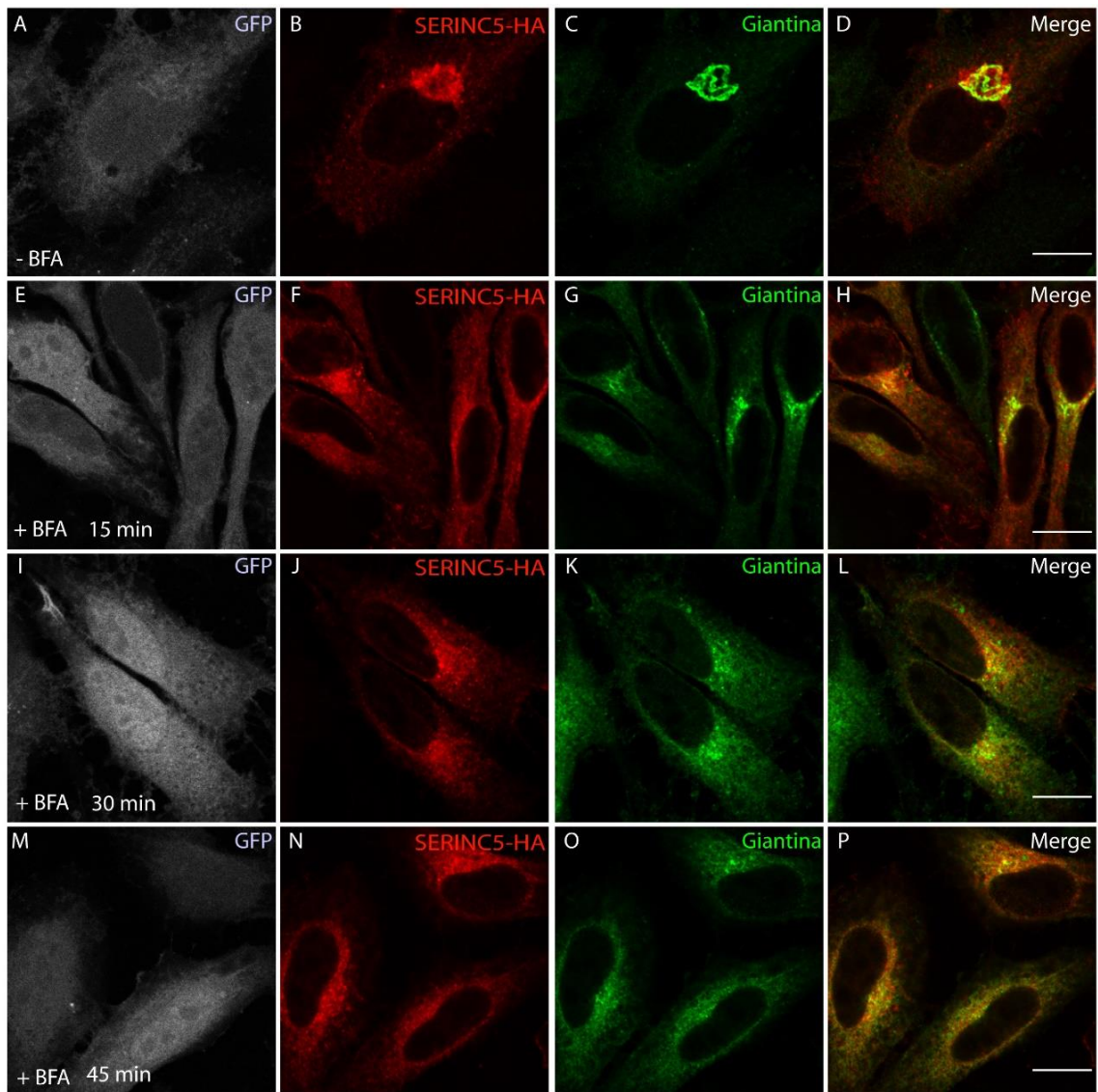


Figura 21. Acúmulo de SERINC5 na região do Golgi em células expressando Nef é sensível à Brefeldina A (BFA). Células HeLa CCL-2 foram co-transfectadas com pIRES-GFP-Nef e pcDNA-SERINC5-HA. Após 24h, as células foram tratadas com 5mg/ml de BFA à 37°C por 15 minutos (21 E-H), 30 minutos (21 I-L), ou 45 minutos (21 M-P). As células controle permaneceram com meio de cultura sem BFA (21 A-D). Após os tempos de tratamento, as células foram fixadas, permeabilizadas e imunomarcadas para HA e giantina. As imagens foram capturadas em microscópio confocal *Zeiss confocal laser scanning microscope* (LSM) 780 e processadas no programa Image J 1.36. Barra de escala, 10 μ m.

4.3. AP-1 está envolvido na regulação negativa de SERINC5 por Nef

Após verificar os efeitos da inibição de ARF-GEF na retenção de SERINC5 no complexo de Golgi, decidimos investigar o papel de AP-1 neste processo. Como revisado anteriormente, AP-1 é um heterotetrâmero composto pelas subunidades: β 1, γ , μ 1 e σ 1. Além disso, AP-1 facilita o tráfego mediado por vesículas de clatrina entre TGN e endossomos (Bonifacino, 2014; Robinson, 2015). Assim, foi investigado se o envio de SERINC5 por Nef para a região justanuclear é dependente de AP-1 através da depleção

da subunidade $\gamma 1$ de AP-1 por estratégia de RNA de interferência. A análise das células silenciadas por *western blotting* mostra que o silenciamento de $\gamma 1$ foi eficiente e que não alterou os níveis totais de SERINC5 (figura 22). Na condição em que as células foram tratadas com siRNA controle (figura 23 A-H), $\gamma 1$ e SERINC5 estão concentrados na região justanuclear na presença de Nef (figura 23 E-H). Aproximadamente 76% de SERINC5 co-localizou com $\gamma 1$ (tabela 2; figura 23 H). Em células expressando Nef e depletadas de $\gamma 1$, Nef não foi capaz de concentrar SERINC5 na região justanuclear como na condição controle. Nessas células, $\gamma 1$ -deficientes e expressando Nef, SERINC5 encontra-se acumulado em pontos dispersos no citoplasma e também na periferia da célula (figura 23 M-P). Este resultado sugere que a subunidade $\gamma 1$ de AP-1 é relevante para a regulação negativa de SERINC5 por Nef de HIV-1. As pesquisas realizadas até então indicam apenas que AP-2 está envolvido na atuação de Nef sobre SERINC5 (Rosa et al., 2015; Shi et al., 2018).

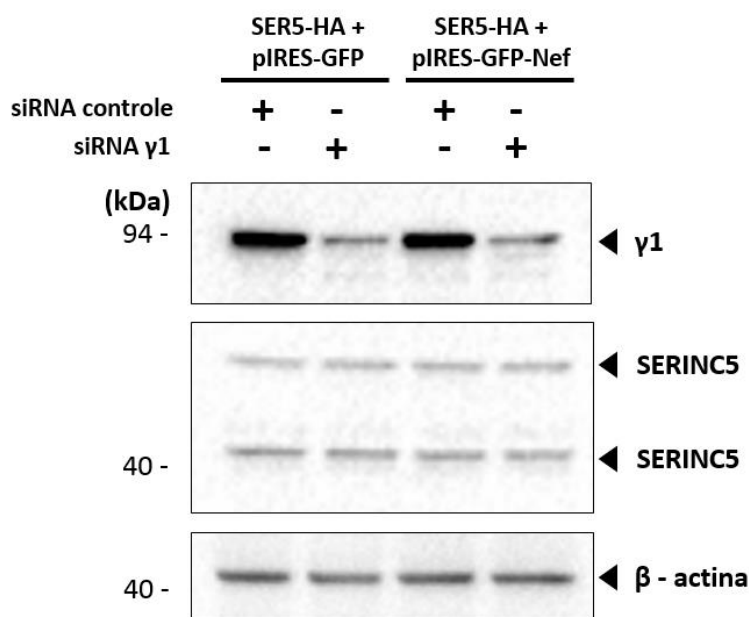


Figura 22. Depleção da subunidade $\gamma 1$ de AP-1 em células HeLa. Células HeLa foram transfectadas com siRNA controle ou com siRNA para $\gamma 1$. Após a segunda transfecção com siRNA (detalhes em materiais e métodos, item 3.6 e figura 17), as células foram co-transfectadas com pcDNA-SERINC5-HA e pIRES-GFP ou pcDNA-SERINC5-HA e pIRES-GFP-Nef.

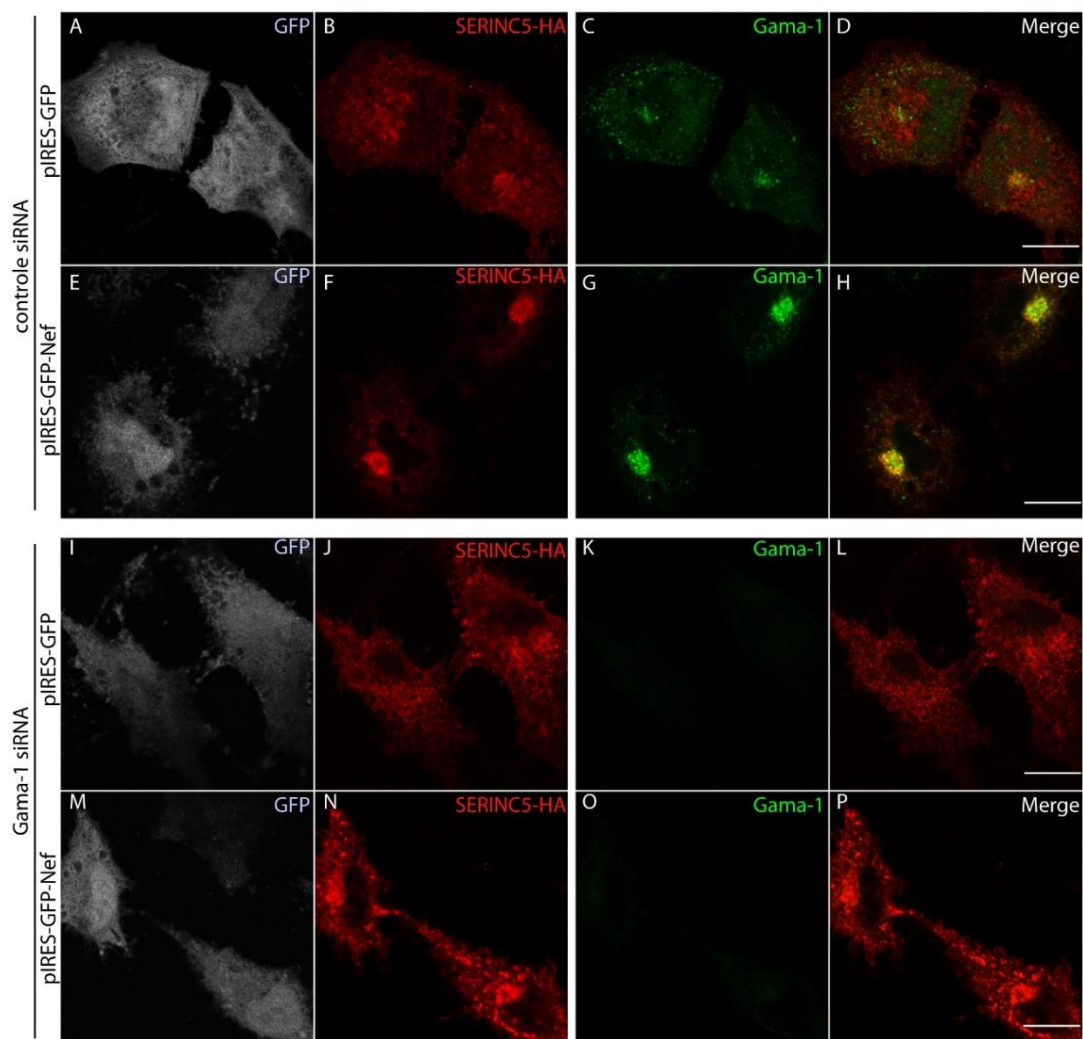


Figura 23. Depleção da subunidade $\gamma 1$ de AP-1 previne a re-distribuição de SERINC5 para a região justanuclear induzido por Nef. Células HeLa foram transfectadas com siRNA controle (23 A-H) ou com siRNA para $\gamma 1$ (23 I-P). Após a segunda transfecção com siRNA (detalhes em materiais e métodos, item 3.5 e figura 17), as células foram co-transfectadas com pcDNA-SERINC5-HA e pIRES-GFP (23 A-D e 23 I-L) ou pcDNA-SERINC5-HA e pIRES-GFP-Nef (23 E-H e 23 M-P). Após 24h de transfecção, as células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anti-HA e anti-gama1. As imagens foram capturadas em microscópio confocal *Zeiss confocal laser scanning microscope (LSM) 780* e processadas no programa Image J 1.36. Barra de escala, 10 μm .

Coeficiente de Manders (*Threshold*)

Proteínas	tM1	tM2
SERINC5-HA and AP1 γ 1	$0,76 \pm 0,01$ n=5	$0,67 \pm 0,06$ n=5

Tabela 2. Análise quantitativa da co-localização entre os sinais de SERINC5 e AP1 γ 1. A quantificação da co-localização foi calculada com o *plugin Colocalization Threshold* do programa Image J. O coeficiente de Manders (M) foi determinado aplicando o threshold (tM) e calculado automaticamente através do algoritmo de Costes et al. (2004). O coeficiente de Manders pode variar entre 0 e 1, correspondendo a não co-localização e co-localização total, respectivamente. O coeficiente de co-localização de Mander tM1, é definido como a intensidade total de pixels do canal 1 (594) que se sobrepõe ao canal 2 (647), relativo ao total da intensidade do canal 1. O coeficiente tM2 é definido como a intensidade total de pixels do canal 2 (647) que se sobrepõe ao canal 1 (594), relativo ao total de intensidade do canal 2. A tabela mostra a média \pm o desvio padrão do coeficiente de Manders indicando a sobreposição entre o sinal de SERINC5 e AP1 γ 1. Os dados foram obtidos de uma série com cortes em Z (com intervalos de 0,3 μm).

Já é conhecido que Nef interage com três complexos AP: AP-1, AP-2 e AP-3 (Bresnahan et al., 1998; Greenberg et al., 1998; Le Gall et al., 1998; Piguet et al., 1998; Craig et al., 2000; Erdtmann et al., 2000; Janvier et al., 2003a,b). Sendo assim, o ensaio de BiFC e microscopia confocal foram realizados para investigar se SERINC5 localiza-se em regiões onde ocorre interação entre Nef e AP-1 (subunidade μ 1A). Conseqüentemente, através destes resultados surgiriam evidências sobre o recrutamento de AP-1 por Nef na atuação contra SERINC5. Células HeLa foram co-transfectadas com SERINC5-HA e constructos codificantes para Nef e μ 1A fusionados ao N- ou C-terminal da proteína fluorescente Venus, respectivamente (Nef-VNt e VCt- μ 1A), como descrito nos materiais e métodos. A interação entre Nef e AP-1 (μ 1A) permitiu a reconstituição de Venus. SERINC5 foi identificado co-localizando com estruturas positivas para a interação entre Nef-VNt e VCt- μ 1A, em aproximadamente 60% (figura 24 E e tabela 3). Estruturas positivas para Venus, SERINC5 e γ 1 apresentaram co-localização parcial na região justanuclear (figura 24 D). Aproximadamente 66% da marcação para γ 1 co-localizou com BiFC (figura 24 F) e 68% com SERINC5 (figura 24 G). Os resultados obtidos podem ser considerados um suporte adicional à hipótese de que Nef utiliza AP-1 para regular negativamente SERINC5.

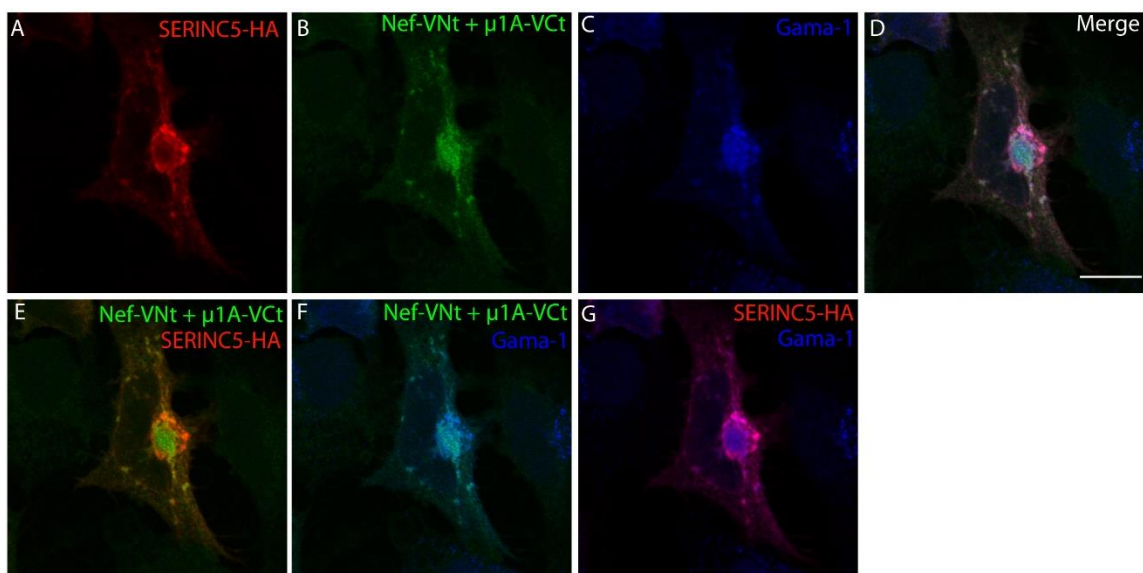


Figura 24. Nef interage com a subunidade μ 1A do complexo proteína adaptadora 1 (AP-1) no ensaio BIFC e co-localiza com SERINC5. No ensaio BIFC, células HeLa foram co-transfectadas com pcDNA-SERINC5-HA, pcDNA3.1/Zeo codificando Nef fusionado aos resíduos 1-158 da proteína Venus (Nef-VNt) e μ 1A fusionado aos resíduos 159-239 de Venus (VCt- μ 1A). As células foram fixadas 8h após a co-transfecção, permeabilizadas e marcadas com anticorpos primários anti-HA e anti-Gama1, e em seguida com anticorpos secundários. As imagens foram capturadas em microscópio confocal *Zeiss confocal laser scanning microscope* (LSM) 780 e processadas no programa Image J 1.36. Barra de escala, 10 μ m.

Coeficiente de Manders (*Threshold*)

Proteínas	tM1	tM2
BiFC (Nef-VNt+VcT- μ 1A) e SERINC5-HA	0,73 \pm 0,01 n=5	0,60 \pm 0,04 n=5
BiFC (Nef-VNt + VcT- μ 1A) e AP1 γ 1	0,70 \pm 0,05 n=5	0,66 \pm 0,03 n=5
SERINC5-HA e AP1 γ 1	0,76 \pm 0,02 n=5	0,68 \pm 0,06 n=5

Tabela 3. Análise quantitativa da co-localização entre os sinais de SERINC5, BiFC e AP1 γ 1. A quantificação da co-localização foi calculada com o *plugin Colocalization Threshold* do programa Image J. O coeficiente de Manders (M) foi determinado aplicando o threshold (tM) e calculado automaticamente através do algoritmo de Costes et al. (2004). O coeficiente de Manders pode variar entre 0 e 1, correspondendo a não co-localização e co-localização total, respectivamente. O coeficiente de co-localização de Mander tM1, é definido como a intensidade total de pixels do canal 1 (594) que se sobrepõe ao canal 2 (647), relativo ao total da intensidade do canal 1. O coeficiente tM2 é definido como a intensidade total de pixels do canal 2 (647) que se sobrepõe ao canal 1 (594), relativo ao total de intensidade do canal 2. A tabela mostra a média \pm o desvio padrão do coeficiente de Manders indicando a sobreposição entre os sinais de SERINC5, BiFC e AP1 γ 1. Os dados foram obtidos de uma série com cortes em Z (com intervalos de 0,3 μ m).

4.4. Envolvimento de endossomos primários na ação de Nef contra SERINC5

Os endossomos são organelas fundamentais da via secretória e endocítica pois fazem a conexão do tráfego entre organelas celulares. A Rab5 é uma proteína periférica de membrana presente em endossomos primários, membro da superfamília Ras de GTPases que participa na fusão de membranas endossomais e na biogênese de endossomos (Woodman, 2000). Uma vez em endossomos primários, as proteínas endocitadas podem ser enviadas para o TGN através de transporte retrógrado, ou para degradação nos lisossomos ou para reciclagem de volta à membrana plasmática (Jovic et al., 2010).

Através do ensaio de imunofluorescência foi investigado se os endossomos primários Rab5⁺ possuem papel importante na rota endocítica de SERINC5 na presença de Nef. Quando uma forma mutante de Rab5 incapaz de hidrolisar GTP (Rab5-YFP-Q79L, forma constitutivamente ativa) é expressa pode-se observar nas células os endossomos primários aumentados, efeito decorrente da interrupção no funcionamento destas organelas e no tráfego de carga (Barbieri et al., 1996). Na ausência de Nef, quando foram co-transfectados os plasmídeos pCIneo-vazio, pcDNA-SERINC5-HA e Rab5-YFP-WT (25 A-C) ou Rab5-YFP-Q79L (25 D-F), a localização de SERINC5 não foi muita alterada, ou seja, SERINC5 continua na periferia da célula, possivelmente na membrana plasmática. Além disso, quando o mutante é expresso na ausência de Nef, SERINC5 intracelular colocaliza com Rab5-YFP-Q79L (figura 25 D-F) indicando que o

tráfego normal de SERINC5 envolve a sua passagem pelo endossomo primário. Em células expressando Nef, a marcação de SERINC5 apresenta pouca sobreposição com Rab5-YFP (figura 25 G-I), indicando que o endossomo primário não representa o local preferencial de retenção dessas moléculas durante a regulação negativa mediada por Nef. Porém, com a co-expressão de Nef e Rab5 mutante ocorre maior retenção de SERINC5 em endossomos aumentados (figura 25 J-L). Este resultado pode ser um indicativo de que SERINC5 é direcionado à endossomos primários Rab5⁺ na presença de Nef, mas não fica retido nesta organela. O fato de que SERINC5 não se encontra na região justanuclear quando Rab5 mutante é expresso, sugere que a endocitose de SERINC5 e sua passagem pelos endossomos primários parece ocorrer antes do acúmulo de SERINC5 no TGN.

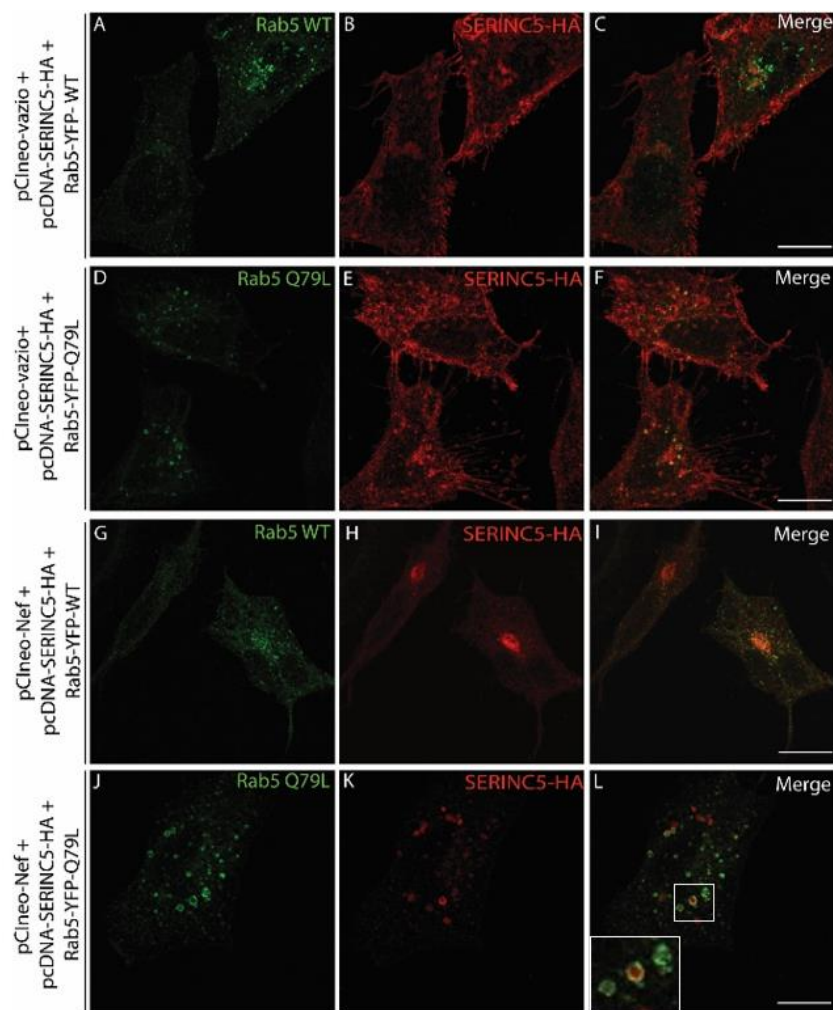


Figura 25. Rab 5 GTPase está envolvida na regulação negativa de SERINC5 por Nef. Células HeLa foram transfectadas com pCIneo-vazio, pcDNA-SERINC5-HA e Rab5-YFP-WT (25 A-C) ou com Rab5-YFP-Q79L (25 D-F). Para avaliar o efeito de Nef as células foram transfectadas com pCIneo-Nef, pcDNA-SERINC5-HA e Rab5-YFP-WT (25 G-I) ou com Rab5-YFP-Q79L (25 J-L). Após 24h de transfecção, as células foram marcadas com anti-HA (camundongo) seguida pela incubação com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa-594 (em vermelho). As imagens foram capturadas em microscópio confocal *Zeiss confocal laser scanning microscope* (LSM) 780 e processadas no programa Image J 1.36. Barra de escala, 10 μ m.

4.5. Evidencia de que Nef direciona SERINC5 para a via dos corpos multivesiculares (MVBs) utilizando a maquinaria ESCRT

Estudos anteriores mostraram que Nef reduz a expressão de receptores na superfície das células, enviando-os para a via de endossomos tardios multivesiculares, também conhecidos como corpos multivesiculares ou MBVs e, finalmente, para a degradação em lisossomos (Shaefer et al., 2008; daSilva et al., 2009). A entrega de proteínas carga transmembrana para vesículas intraluminais (ILVs) de MVBs é um processo finamente regulado que, em muitos casos, requer o reconhecimento de sinais pela maquinaria ESCRT (Hurley e Hanson, 2010). De fato, o direcionamento de CD4 para lisossomos por Nef requer componentes desta maquinaria (daSilva et al., 2009).

Sendo assim, foi verificado se componentes ESCRTs estão envolvidos na ação de Nef sobre SERINC5. A super-expressão da proteína HRS (componente do ESCRT-0) tem um efeito dominante negativo na maquinaria ESCRT (Bishop et al., 2002). HRS é responsável por enviar proteínas carga para a via de MVBs e iniciar a cascata da maquinaria. Deste modo, o experimento realizado interrompeu a cascata sequencial de eventos logo no seu início através da super-expressão de HRS (Bishop et al., 2012; Bache et al., 2003). Em células que super expressam HRS, 90% de HRS-GFP co-localiza com SERINC5 na presença de Nef em vesículas próximas à região perinuclear (figura 26 A-C e tabela 4).

VPS4-WT e VPS4-E/Q (mutante E223Q) também foram co-transfectados com SERINC5. A proteína VPS4 é requerida para finalizar a ação da maquinaria ESCRT e importante para que ocorra a posterior reciclagem dos componentes (Babst et al., 1998). O mutante VPS4-E/Q é incapaz de hidrolisar ATP. A análise por imunofluorescência indireta mostrou que em células expressando Nef, 87% de VPS4-E/Q co-localiza com SERINC5 (figura 26 G-I e tabela 4). Pode-se observar o acúmulo de SERINC5 em vesículas aumentadas co-localizando com VPS4-E/Q. Além disso, a expressão do mutante dominante negativo VPS4-E/Q alterou a distribuição de SERINC5 na região perinuclear. Com este experimento foi possível observar o acúmulo de SERINC5 em endossomos que podemos inferir como um bloqueio na sua via de degradação. Deste modo, esta pode ser uma evidência do envolvimento da maquinaria ESCRT na regulação negativa de SERINC5 induzida por Nef através da via de MVBs em rota para os lisossomos.

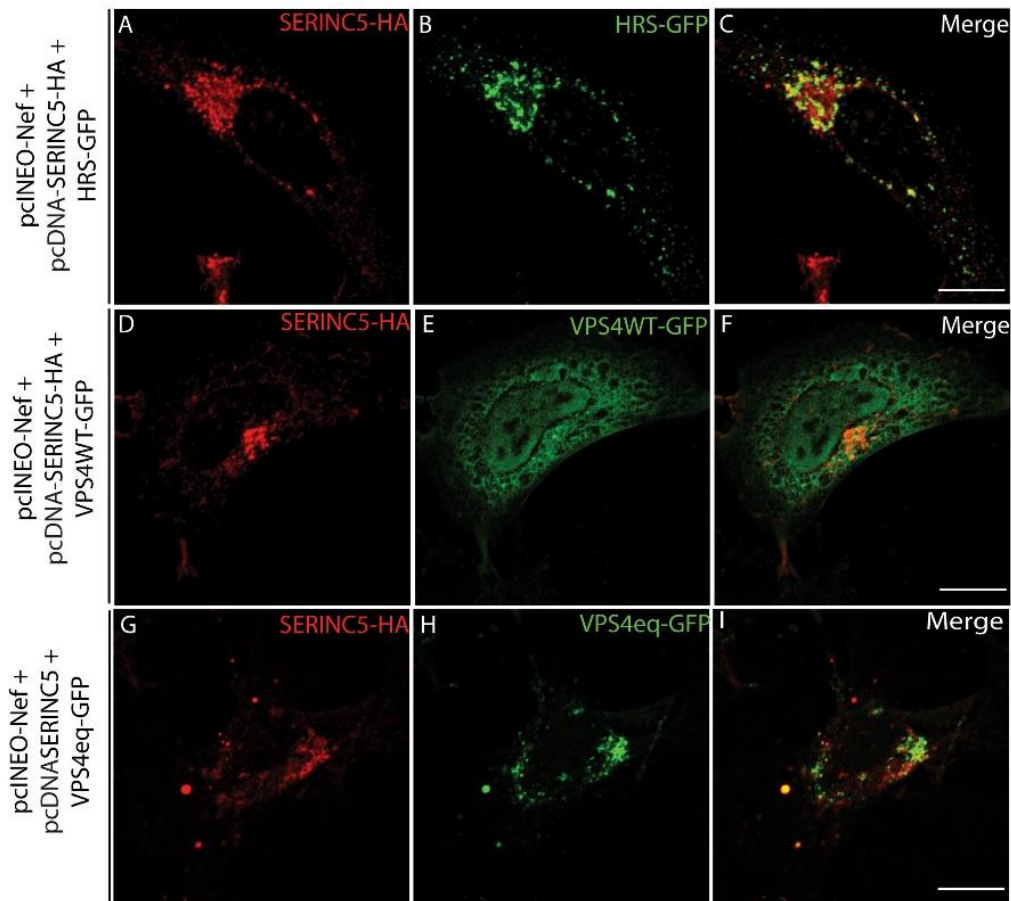


Figura 26. Acúmulo de SERINC5 em endossomos de células expressando Nef e dominantes negativos da maquinaria ESCRT. Células HeLa foram transfectadas com pcINEO-Nef, pcDNA-SERINC5-HA e HRS-GFP (26 A-C), sendo a condição de super expressão de um componente do ESCRT-0. As células também foram transfectadas com pcINEO-Nef, pcDNA-SERINC5-HA e VPS4WT-GFP (26 D-F) ou VPS4-E/Q-GFP (26 G-I). Após 24h de transfecção, as células foram marcadas com anti-HA (camundongo) seguida pela incubação com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa-594 (em vermelho). As imagens foram capturadas em microscópio confocal *Zeiss confocal laser scanning microscope* (LSM) 780 e processadas no programa Image J 1.36. Barra de escala, 10 μ m.

Coeficiente de Manders (*Threshold*)

Proteínas	tM1	tM2
SERINC5-HA e HRS-GFP	$0,69 \pm 0,05$ n=6	$0,90 \pm 0,02$ n=6
SERINC5-HA e VPS4-E/Q-GFP	$0,56 \pm 0,03$ n=7	$0,87 \pm 0,02$ n=7

Tabela 4. Análise quantitativa da co-localização entre sinais de SERINC5 e de dominantes negativos da maquinaria ESCRT em células HeLa CCL2 expressando Nef. A quantificação da co-localização foi calculada com o *plugin Colocalization Threshold* do programa Image J. O coeficiente de Manders (M) foi determinado aplicando o threshold (tM) e calculado automaticamente através do algoritmo de Costes et al. (2004). O coeficiente de Manders pode variar entre 0 e 1, correspondendo a não co-localização e co-localização total, respectivamente. O coeficiente de co-localização de Mander tM1, é definido como a intensidade total de pixels do canal 1 (594) que se sobrepõe ao canal 2 (647), relativo ao total da intensidade do canal 1. O coeficiente tM2 é definido como a intensidade total de pixels do canal 2 (647) que se sobrepõe ao canal 1 (594), relativo ao total de intensidade do canal 2. A tabela mostra a média \pm o desvio padrão do coeficiente de Manders indicando a sobreposição entre o sinal de SERINC5 e de dominantes negativos da maquinaria ESCRT, HRS-GFP e VPS4-E/Q-GFP. Os dados foram obtidos de uma série com cortes em Z (com intervalos de 0,3 μ m).

Alix é uma proteína associada aos ESCRTs que atua no recrutamento de carga e deformação de ILVs, e que está mais associada com o envio de cargas não-ubiquitinadas para ILVs (Bissig e Gruenberg, 2014). Foi demonstrado que Nef interage com Alix (da Costa et al., 2009; Amorim et al., 2014), assim como o papel desta interação em endossomos tardios determinando o envio de CD4 para degradação em lisossomos através da maquinaria ESCRT (Amorim et al., 2014).

Vista a importância de Alix, foi investigado se esta proteína, que pode estar associada à maquinaria ESCRT, estaria relacionada com o envio de SERINC5 para a via de MVBs. O ensaio BiFC foi realizado em células HeLa que foram transfectadas com os plasmídeos Alix-VNt e Alix-VCt, juntamente com o pcDNA-SERINC5-HA e o pCIneo-Nef. Já foi reportado que Alix forma dímeros *in vitro* e *in vivo* que permite a reconstituição de Venus e a indicação da localização de Alix nas células (Bissig et al., 2013). No experimento realizado não houve co-localização de dímeros de da proteína Alix com SERINC5 (figura 27 A-C). Apesar de preliminares, os resultados sobre investigação da maquinaria ESCRT apontam para o envio de SERINC5 para via dos MVBs de forma independente de Alix. Porém, em experimento de inibição da função lisossomal não foi observado o aumento nos níveis totais de SERINC5 (figura 28). Neste último experimento foram utilizadas células HEK 293T que expressam SERINC5 endógeno, assim foi necessário transfectar apenas o plasmídeo para expressão de Nef (pIRES-GFP-Nef) ou o plasmídeo controle (pIRES-GFP). Após o tratamento com NH₄Cl ou MG132, e inibição da atividade lisossomal ou proteassomal, respectivamente, não foi observado acúmulo de SERINC5 na presença ou ausência de Nef (figura 28).

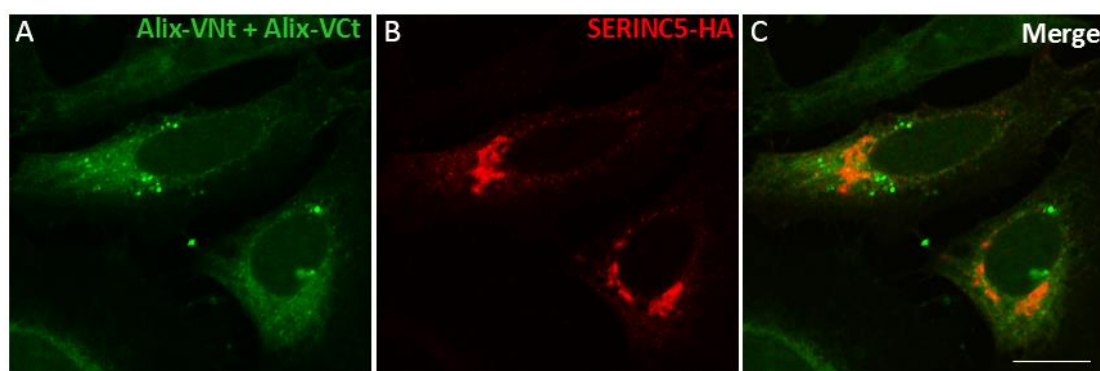


Figura 27. Alix não co-localiza com SERINC5 no ensaio BiFC. Células HeLa foram transfectadas com Alix-VNt, Alix-VCt, pCIneo-nef e pcDNA-SERINC5-HA. Após 8h de transfecção, as células foram marcadas com anti-HA (camundongo) seguida pela incubação com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa-594 (em vermelho). As imagens foram capturadas em microscópio confocal Zeiss *confocal laser scanning microscope* (LSM) 780 e processadas no programa Image J 1.36. Barra de escala, 10 μ m.

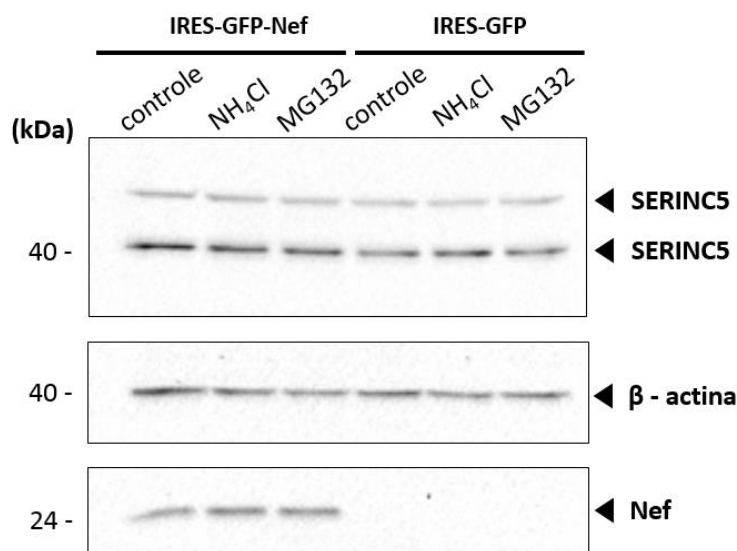


Figura 28. Inibição lisossomal ou proteassomal não leva ao aumento de SERINC5. Células HEK 293T foram transfectadas com pIRES-GFP ou pIRES-GFP-Nef, após 24h de transfecção as células foram tratadas com NH_4Cl (50Mm) ou MG132 (1 μM) por 6h. As células foram coletadas para análise de *western blotting* e o SERINC5 endógeno da HEK 293T foi marcado com anti-SERINC5 (coelho).

4.6. Caracterização da regulação negativa de SERINC5 em células T (linhagem

A3.01) expressando Nef

O ensaio de citometria de fluxo foi realizado para confirmar a ação de Nef na retirada de SERINC5 da membrana plasmática em linfócitos T A3.01. Para isso, as células foram transduzidas com vetor bicistrônico IRES para a expressão apenas de GFP (A3.01 GFP) ou de GFP e Nef (A3.01 Nef/GFP). As células positivas para GFP foram selecionadas por citometria de fluxo e posteriormente cultivadas. As células não foram permeabilizadas para possibilitar a análise apenas de proteínas da superfície celular. A análise de SERINC5 endógeno na membrana plasmática das duas linhagens celulares (A3.01 GFP ou A3.01 Nef/GFP) foi realizada através da marcação com anticorpo primário anti-SERINC5 capaz de reconhecer uma das alças extracelulares dessa proteína (especificada na figura 16), o qual ficou disponível nos últimos meses deste trabalho.

Os resultados de citometria de fluxo indicam que a quantidade de SERINC5 na membrana plasmática de linfócitos T expressando Nef (e GFP) diminuiu quando comparado com linfócitos A3.01 controle (expressando apenas GFP). A expressão de Nef causou redução de aproximadamente 50% de SERINC5 da superfície celular como indicado no gráfico de barras quando comparado com o controle (figura 29). Considerando que as moléculas de SERINC5 analisadas foram apenas as moléculas presentes na superfície celular, este resultado, juntamente com os resultados de

imunofluorescência mostrados anteriormente, confirmam a regulação negativa de SERINC5 por Nef de HIV-1 em linfócitos T. Sendo então a regulação negativa de SERINC5 por Nef caracterizada como a redistribuição de SERINC5 da membrana plasmática para uma região interna da célula. O estabelecimento deste sistema foi importante, pois será usado em nosso laboratório para testar se AP-1 também é requerido para a regulação negativa de SERINC5 por Nef em linfócitos.

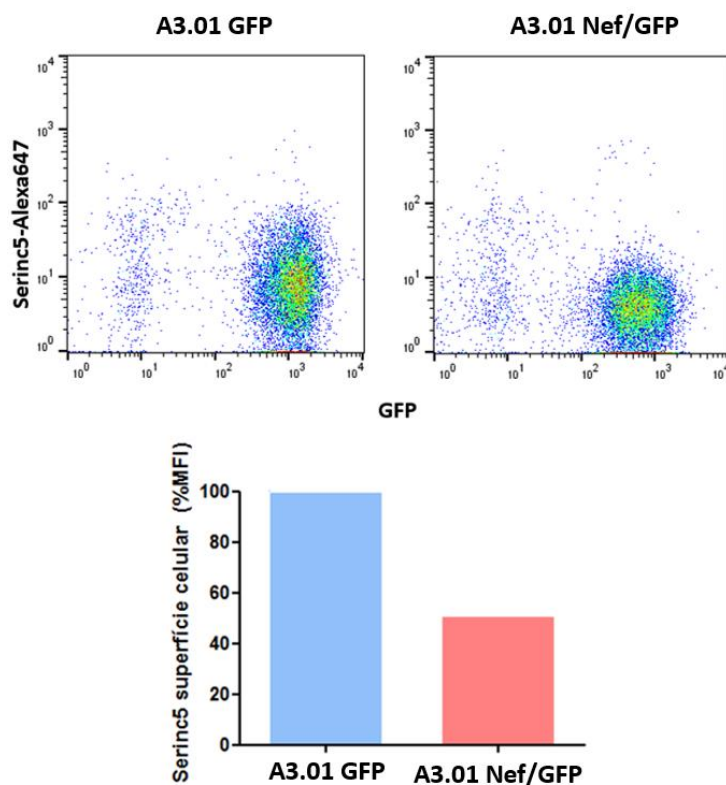


Figura 29. Regulação negativa de SERINC5 na superfície de linfócitos T expressando Nef/GFP. Células T CD4⁺ A3.01 foram transduzidas com retrovírus para a expressão de Nef/GFP ou apenas GFP. Células expressando GFP foram selecionadas por citometria de fluxo. As células selecionadas foram cultivadas e marcadas com anti-SERINC5 e anticorpo secundário F(ab')₂ anti-coelho (alexa fluor 647), fixadas e analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto II. O gráfico de barras representa a média da intensidade da fluorescência para SERINC5 obtida no histograma. O nível de SERINC5 na superfície de células controle (A3.01 GFP) foi considerado como 100%. Os dados foram analisados usando o programa FlowJo.

4.7. A retirada de SERINC5 da superfície celular por Nef evita sua incorporação nas partículas virais

A análise da incorporação de SERINC5 em vírions produzidos na presença ou ausência de Nef foi realizada a partir da produção das partículas virais em células HEK293T. As células foram transfectadas com pcDNA-SERINC5-HA e com os plasmídeos provirais pNL43 WT ou pNL43 ΔNef (defectivo para Nef), e após a produção

da progênie os vírus foram purificados do sobrenadante por ultracentrifugação. O ensaio de *western blotting* foi realizado para verificar a quantidade de SERINC5 presente nas células e nos vírus. Células transfectadas com pNL43 Δ Nef produziram partículas de HIV-1 com uma quantidade maior de SERINC5 do que as células transfectadas com pNL43 WT. Na presença de Nef, SERINC5 é relocado da membrana plasmática para uma região interna da célula onde, provavelmente, não pode mais ser incorporado nos vírus que estão sendo produzidos. Foram feitos os controles com a transfecção apenas de SERINC5 ou apenas dos plasmídeos provirais (figura 30). O resultado obtido está de acordo com a literatura que associa a presença de Nef com a redução de SERINC5 nas partículas virais (Rosa et al., 2015) e nos possibilitará agora testar a participação de AP-1 neste processo.

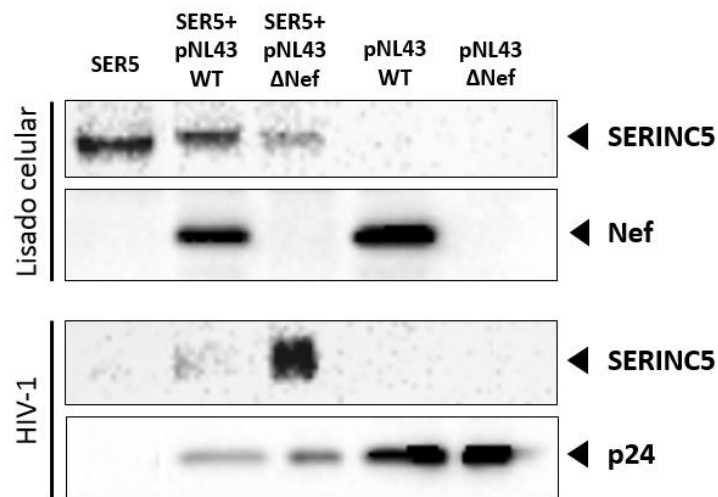


Figura 30. A regulação negativa de SERINC5 por Nef previne sua incorporação nos vírions. *Western blotting* do lisado celular das células produtoras de vírus (HEK293T) e das respectivas partículas virais HIV-1 produzidas (pNL43 WT) e (pNL43 Δ Nef, defeitivo para Nef). Os vírions foram produzidos a partir do plasmídeo proviral transfectado em células HEK293T e purificados por ultracentrifugação. O anticorpo anti-HA foi utilizado para identificação de SERINC5 produzido a partir da transfecção do pcDNA-SERINC5-HA.

DISCUSSÃO

5. Discussão

Os retrovírus constituem um modelo interessante para o estudo da interação entre patógeno e hospedeiro. Os estudos se direcionam para um melhor entendimento tanto da biologia celular do hospedeiro quanto da biologia do próprio patógeno (Waheed et al., 2012). Com o aprofundamento das pesquisas científicas, o número de fatores de restrição intrínsecos da célula hospedeira conhecidos com atividade antirretroviral contra HIV-1 tem aumentado nos últimos anos (Soliman et al., 2017). A proteína celular SERINC5 foi descoberta recentemente como um potente fator de restrição celular neutralizado pela proteína Nef de HIV-1 (Rosa et al., 2015; Usami et al., 2015). Apesar de sua atividade biológica ainda ser pouco conhecida, sabe-se que SERINC5 é responsável pela incorporação do amino ácido serina em fosfatidilserina e esfingolípídeos na membrana (Inuzuka et al., 2005). Nos últimos anos muitas pesquisas foram realizadas na tentativa de explicar a atividade antiviral de SERINC5, e também como a proteína Nef é capaz de neutralizar sua ação e conseqüentemente aumentar a infectividade viral.

Há mais de 20 anos atrás foi demonstrado que a proteína acessória Nef é capaz de aumentar a infectividade do HIV-1 (Chowers et al., 1994; Miller et al., 1994), porém a explicação para este efeito permaneceu obscura até a descoberta da relação entre Nef e SERINC5. Descobertas relevantes ocorreram ao longo destes anos. Em 1995, foi publicado um estudo sobre o aumento da infectividade do vírion ser dependente da presença de Nef na célula produtora de vírus (Aiken et al., 1994). Dois anos depois foi demonstrado que o efeito de Nef depende de Env (Aiken, 1997). Em 2007, um importante estudo esclareceu um pouco mais sobre essa função de Nef. Pizzato et al. (2007) mostraram que a dinamina 2 interage com Nef e que estas duas proteínas são requeridas para aumentar a infectividade viral, assim como a endocitose mediada por clatrina. Experimentos de expressão de dominante negativo, de depleção de dinamina 2, e de resgate de fenótipo, confirmaram essa hipótese. Os resultados apresentados por Pizzato et al. (2007) confirmaram que o efeito de Nef no aumento da infectividade depende de eventos que ocorrem na célula produtora de vírus.

Os primeiros estudos sobre SERINC5 demonstraram que se trata de uma proteína transmembrana celular eficientemente incorporada em novas partículas virais na etapa de brotamento do vírus. Uma vez que SERINC5 está presente na partícula viral, a entrada do vírus na próxima célula alvo é prejudicada. Nef age contra SERINC5 na célula produtora de vírus, estimulando a endocitose desta proteína transmembrana para

compartimentos intracelulares, evitando sua incorporação em novos vírions (Rosa et al., 2015). Investigações posteriores buscaram compreender como SERINC5 incorporado no vírion poderia interferir na formação do poro de fusão do HIV-1. As pesquisas demonstram que vírions contendo SERINC5 são menos eficientes em entregar o capsídeo viral no citoplasma da célula alvo (Schulte et al., 2018). Beitari et al. (2017) mostraram que a proteína Env de algumas cepas de HIV-1 são resistentes à ação de SERINC5, enquanto outras são sensíveis. Apesar de não ter sido encontrada interação direta entre Env e SERINC5, foi proposto que SERINC5 aumenta a exposição de domínios conservados de gp41 possivelmente através de mudança conformacional. Os domínios conservados expostos são sensíveis à anticorpos neutralizantes (Sood et al., 2017). Porém muito pouco foi investigado na tentativa de explicar os mecanismos moleculares envolvendo a retirada de SERINC5 dos sítios de montagem viral na presença de Nef.

Existem fortes evidências do deslocamento de SERINC5 da membrana plasmática para o interior da célula na presença de Nef. Através de imunofluorescência e microscopia, SERINC5-GFP foi observado localizar-se majoritariamente na periferia celular em células JTAG. Porém na presença de Nef, SERINC5-GFP muda de localização passando a co-localizar parcialmente com Rab7 (Rosa et al., 2015). Neste trabalho confirmamos, a alteração da localização de SERINC5 na presença de Nef em células HeLa (figura 19). Demonstramos que SERINC5 é direcionado por Nef para uma região justanuclear, e portanto, evitando a presença de SERINC5 na membrana plasmática onde poderia ser incorporado nos novos vírions. Além disso, observamos alta co-localização de SERINC5 com proteínas residentes no cis-Golgi (giantina) e trans-Golgi (TGN46) (figura 20).

As evidências de que Nef re-localiza SERINC5 para compartimentos do Golgi, foram reforçadas por meio do tratamento de células expressando Nef e SERINC5 com brefeldina A (figura 21). Essa droga inibe o complexo GEF-Arf-GDP, prevenindo a conversão de Arf-GDP em Arf-GTP e a associação do complexo COPI na membrana do Golgi (Niu et al., 2005). Desta forma, brefeldina A perturba a dinâmica do transporte RE-Golgi, levando ao colapso do complexo de Golgi dispersão de suas proteínas. O tratamento agudo com brefeldina A provocou a dispersão pelo citoplasma de SERINC5, concentrado na região justanuclear por Nef. Esse resultado confirma o redirecionamento de SERINC5 para o complexo de Golgi por Nef, sugerindo que esta proteína viral subverte a maquinaria de tráfego vesicular para induzir a retenção de SERINC5 no

complexo de Golgi. Neste trabalho, as investigações foram realizadas com SERINC5-001 que é a isoforma que melhor restringe a infectividade do HIV-1 (Zhang et al., 2017).

Em relação aos APs, fortes evidências apontam a necessidade de AP-2 na atuação de Nef contra SERINC5. Mutações para evitar a miristoilação amino-terminal de Nef (G2A), ou para evitar a ligação com dinamina 2 (D123A), ou ainda no domínio di-leucina necessário para interação com AP-2 (LL165AA), prejudicam a neutralização de SERINC5 por Nef. Aliado a isso, o silenciamento de AP-2 por shRNA em células produtoras de vírus (HEK293T), resultou na produção de partículas menos infecciosas mesmo na presença de Nef (Rosa et al., 2015). Ressalta-se, entretanto, que o efeito observado pela depleção de AP-2 pode não estar relacionado a SERINC5, já que Nef utiliza AP-2 para reduzir a expressão de outras proteínas na membrana plasmática.

Vírus produzidos em células JTAg SERINC5^{-/-} expressando SERINC5-HA na ausência de Nef (com plasmídeo proviral defectivo para Nef), apresentam SERINC5-HA no envelope lipídico. O que ocorreu também com vírus produzidos na presença de Nef mutante (LL165AA) no domínio de interação com AP-2. Vírus produzidos na presença de Nef *wild type* incorporaram pouco SERINC5-HA no envelope de novos vírions (Rosa et al., 2015). Entretanto, vale lembrar que o domínio LL165AA de Nef também media interação com AP-1 e AP-3 (Janvier et al., 2003; Tavares et al., 2017) e a ausência dessas interações também poderiam contribuir para a perda da capacidade de antagonizar SERINC5.

De fato, os experimentos realizados neste trabalho indicam que AP-1 também atua na regulação negativa de SERINC5 coordenada por Nef e em sua retenção no complexo de Golgi. O ensaio de BiFC mostrou que Nef interage com μ 1A e colocaliza com SERINC5 e γ 1 (figura 24). Em células HeLa depletadas para γ 1 e na presença de Nef, SERINC5 encontra-se disperso pelo citoplasma e na periferia das células ao invés de concentrar-se na região justanuclear (figura 23). O uso de AP-1 por Nef para neutralizar SERINC5 seria então uma similaridade com a regulação negativa de MHC-I, na qual o complexo MHC-I/Nef interage diretamente com a subunidade μ 1 (Noviello et al., 2008). De fato, durante a realização do presente trabalho, Shi et al. (2018) utilizaram o ensaio de BiFC para mostrar a interação entre Nef e SERINC5 na região justanuclear. Os constructos de Nef-WT e SERINC5 com as metades da proteína Venus fluoresceram fortemente, assim como o controle utilizado com os pares Nef-WT e CD4. O ensaio também foi realizado com SERINC5 e um mutante de Nef, o Nef-4D, que possui quatro substituições por resíduos hidrofóbicos na região do core (I109, L112, W115, F121),

neste experimento não ocorreu interação entre SERINC5 e Nef-4D. Os sinais de fluorescência foram detectados por citometria de fluxo.

Algumas investigações já foram realizadas a respeito da presença de SERINC5 em endossomos, organelas essenciais da via secretória e endocítica. A primeira evidência registrada foi a localização parcial de SERINC5 em endossomos tardios Rab7-positivos na presença de Nef (Rosa et al., 2015). Os experimentos de Shi et al. (2018) mostraram alta co-localização de complexos de interação Nef-SERINC5 (BiFC) com Rab5, Rab7 e Rab11, ou seja, endossomos primários, tardios e de reciclagem, respectivamente (Shi et al., 2018). No presente estudo observamos o direcionamento de SERINC5 para endossomos aumentados quando um mutante de Rab5 incapaz de hidrolisar GTP é expresso na presença de Nef. Nestas condições, SERINC5 não se encontra acumulado na região justanuclear (figura 25). Este resultado sugere que a regulação negativa de SERINC5 por Nef depende de AP-1 e o acúmulo de SERINC5 na região justanuclear ocorre após a endocitose e passagem de SERINC5 pelos endossomos primários Rab 5 positivos (figura 31). Outros experimentos são necessários para a confirmação deste mecanismo, porém este resultado é indicativo da ocorrência de transporte retrógrado via AP-1 de SERINC5 proveniente da membrana plasmática que passa por endossomos até chegar no TGN. O que seria outra semelhança com a retirada de MHC-I da superfície celular por Nef. Ensaio BiFC e microscopia de super resolução mostraram que o complexo de interação Nef/MHC-I trafega em endossomos primários Rab5⁺ e endossomos tardios Rab7⁺ até chegar no TGN (Dirk et al., 2016).

Após serem endocitadas, algumas proteínas são recicladas e enviadas de volta para a membrana plasmática e outras para degradação nos lisossomos, ou ainda enviadas para o TGN. Proteínas que devem ser degradadas são enviadas para endossomos primários e depois para endossomos tardios/MVBs. A maquinaria ESCRT, composta por quatro complexos e por componentes acessórios que são finamente regulados, desempenha funções importantes na via de degradação em lisossomos. O complexo ESCRT reconhece carga ubiquitinada e deforma membranas endossomais para formação de vesículas intraluminais dentro dos MVBs. Receptores destinados à degradação em endossomos primários são selecionados pela maquinaria ESCRT e proteínas acessórias para enviar este receptor para a via de MVBs (Raiborg e Stenmark, 2009; Wegner et al., 2011).

Em uma função bem conhecida de Nef, a regulação negativa do receptor CD4, Nef envia CD4 endocitado presente em endossomos para a via de MVBs com participação da maquinaria ESCRT, evitando a reciclagem do receptor. A depleção de TSG101,

componente do ESCRT-I, inibiu a degradação de CD4 dependente de Nef. Além disso, a expressão de um dominante negativo de VPS4 (VPS4E/Q) também inibiu a degradação de CD4 induzida por Nef. Células HeLa transfectadas com VPS4E/Q apresentaram endossomos aumentados contendo CD4 (daSilva et al., 2009). Nos resultados do presente trabalho, a expressão do dominante negativo HRS-GFP ou do mutante VPS4-E/Q, modificou o fenótipo da regulação negativa de SERINC5 por Nef (figura 26). Os resultados sugerem que a maquinaria ESCRT pode estar envolvida com o envio de SERINC5 para a via de MVBs. Contudo, experimentos de inibição da função lisossomal não mostraram aumento nos níveis totais de SERINC5 em células expressando Nef (figura 28), sugerindo que Nef não induz o direcionamento de SERINC5 para degradação lisossomal.

A indução da degradação de SERINC5 por Nef ainda é controversa na literatura. Em experimento de citometria de fluxo realizado na presença e ausência de Nef não foi verificada mudança nos níveis totais intracelulares de SERINC5 (Trautz et al., 2016). Porém segundo Shi et al. (2018), Nef está envolvido no envio de SERINC5 para degradação em lisossomos através de um mecanismo dependente de ubiquitinação. Sendo que neste contexto, Nef não é responsável pela ubiquitinação direta de SERINC5, mas acelera o envio de moléculas de SERINC5 ubiquitinadas para MVBs em rota para os lisossomos (Shi et al., 2018). O envio de proteínas carga para ILVs em MVBs pode ocorrer através de uma via canônica, dependente de ubiquitinação, ou também de forma independente de ubiquitinação. Alix, proteína acessória da maquinaria ESCRTs, está associada com o envio de cargas não-ubiquitinadas para ILVs (Bissig e Gruenberg, 2014). Em relação a CD4, é sabido que Nef promove o envio destas moléculas para degradação via MVBs de maneira dependente de ESCRT (daSilva et al., 2009). Existem evidências que registraram CD4 ubiquitinado na presença de Nef (Shi et al., 2018; daSilva et al., 2009), mas esta modificação parece não ser relevante para a degradação de CD4 via MVBs (daSilva et al., 2009). Nos resultados aqui apresentados, a proteína Alix parece não estar relacionada com o envio de SERINC5 para MVBs. Nos experimentos realizados, o complexo Alix no ensaio BiFC não co-localizou com SERINC5 (figura 27).

O modelo de regulação negativa de SERINC5 por Nef de HIV-1 a partir dos resultados obtidos neste trabalho e de dados da literatura está descrito na figura 31. Primeiramente, SERINC5 alcança a membrana plasmática através da via secretória constitutiva. Nef interage com AP-2 na membrana plasmática e promove a endocitose de SERINC5 para vesículas intracelulares. Uma vez nos endossomos primários, uma

possibilidade para SERINC5 chegar no TGN é através do transporte retrógrado através da ação Nef e AP-1. Deste modo, SERINC5 seria retido no TGN. A partir dos resultados obtidos pode-se inferir que outra possível atuação de Nef seria na prevenção do transporte anterógrado de SERINC5 para a membrana plasmática retendo-o no TGN. O bloqueio no transporte via AP-1 diminui o acúmulo de SERINC5 na região justanuclear, sendo assim, Nef possivelmente utiliza AP-1 para realizar a regulação negativa de SERINC5, além de AP-2. Contudo, investigações adicionais são necessárias para explicar a interferência de Nef na maquinaria de tráfego intracelular a fim de neutralizar a ação de SERINC5 e aumentar a infectividade de HIV-1.

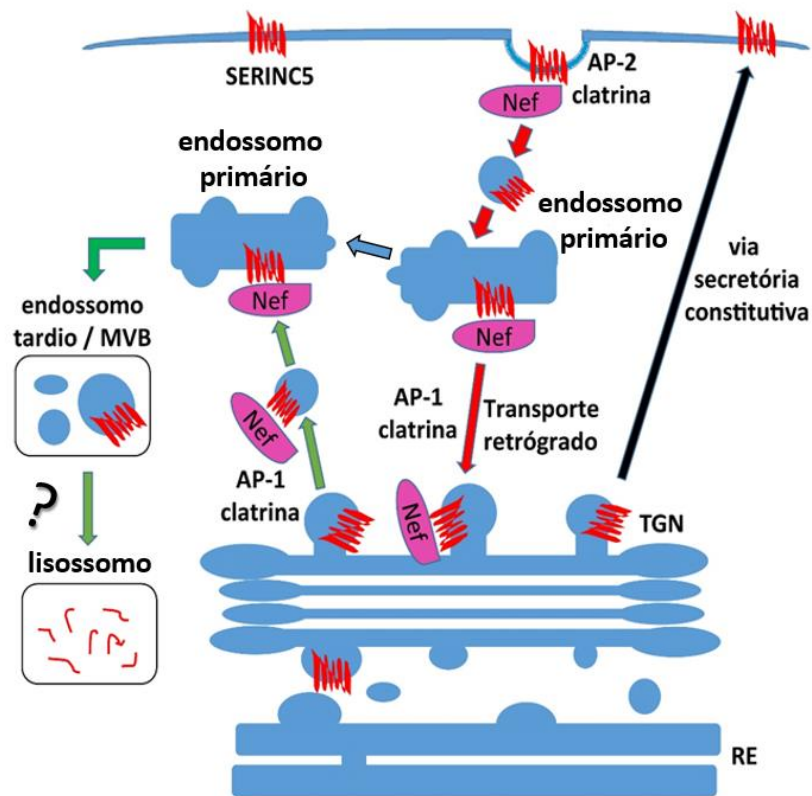


Figura 31. Modelo proposto para o transporte intracelular de SERINC5 em células expressando Nef. SERINC5 chega a membrana plasmática através da via secretória constitutiva (seta preta). De acordo com estudos anteriormente publicados, Nef promove a endocitose de SERINC5 mediada por AP-2 e dependente de clatrina (seta vermelha). Os resultados deste trabalho sugerem que através de transporte retrógrado, moléculas de SERINC5 presente em endossomos primários são enviadas para retenção no TGN, processo que é dependente de AP-1 e Nef. O envio de SERINC5 para degradação em lisossomos ainda é controverso na literatura. Os resultados apontam para o envio de SERINC5 para via de MVBs dependente de ESCRT (seta verde), porém a degradação em lisossomos não foi comprovada no presente estudo.

CONCLUSÃO

6. Conclusão

O presente trabalho investigou a localização subcelular de SERINC5, e demonstrou que na presença de Nef, SERINC5 é direcionado para compartimentos localizados próximo ao núcleo. Na investigação utilizando marcadores foi possível quantificar e verificar uma alta co-localização de SERINC5 com proteínas residentes nas cisternas cis/medial do complexo de Golgi e no TGN. Células tratadas com BFA na presença de Nef apresentaram dissociação de SERINC5 da região justanuclear e consequente dispersão desta proteína pelo citoplasma. A depleção da subunidade $\gamma 1$ de AP-1 demonstrou que este complexo pode estar sendo utilizado por Nef para evitar a presença de SERINC5 na membrana plasmática. O experimento de interação BiFC adicionou uma evidência a este fato pois houve co-localização de SERINC5 nas regiões onde Nef interagiu com $\mu 1A$, outra subunidade de AP-1.

Este trabalho também mostrou o envolvimento de endossomos primários no transporte de SERINC5 na presença de Nef, e sua importância no acúmulo de SERINC5 na região justanuclear. Além disso, os experimentos mostraram que aparentemente Nef direciona SERINC5 para a via dos MVBs utilizando a maquinaria ESCRT de forma independente da proteína Alix. Contudo, neste trabalho não foi possível identificar a degradação de SERINC5 em lisossomos induzida por Nef. Este estudo contribuiu para uma melhor compreensão da ação de Nef frente à neutralização de SERINC5. Ao investigar os mecanismos moleculares do tráfego intracelular de SERINC5 na presença e ausência de Nef, foram identificadas questões importantes sobre o mecanismo de retirada desta proteína da membrana plasmática e seu direcionamento para compartimentos intracelulares onde não pode ser incorporada em novos vírions. O estudo também contribuiu para o entendimento da patogênese do HIV-1, vírus responsável pela morte de milhares de pessoas e por novas infecções que ocorrem todos os anos.

REFERÊNCIAS

7. Referências

ADACHI, A. et al. Generation and characterization of the human immunodeficiency virus type 1 mutants. **Archives of Virology**, v. 117, n. 1-2, p. 45-48, 1991.

AIKEN, C. et al. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. **Cell**, v. 76, n. 5, p. 853-864, nov. 1994.

AIKEN, C. Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A. **Journal of virology**, v. 71, n. 8, p. 5871-5877, aug. 1997.

AIKEN, C. HIV: Antiviral action countered by Nef. **Nature**, v. 526, n. 7572, p. 202-203, oct. 2015.

AMORIM, N. A. et al. Interaction of HIV-1 Nef protein with the host protein Alix promotes lysosomal targeting of CD4 receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 40, p. 27744-27756, oct. 2014.

BABST, M. et al. The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 11, p. 2982-2993, jun. 1998.

BACHE, K. G. et al. Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. **The Journal of Cell Biology**, v. 162, n. 3, p. 435-442, aug. 2003.

BARBIERI, M. A. et al. Characterization of Rab5: Q79L-stimulated endosome fusion. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 326, n. 1, p. 64-72, feb. 1996.

BARRÉ-SINOUSSE, F.; ROSS, A. L.; DELFRAISSY, J. F. Past, present and future: 30 years of HIV research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 12, p.877-883, dec. 2013.

BEITARI, S. Effect of HIV-1 Env on SERINC5 Antagonism. **Journal of Virology**, v. 91, n. 4, jan. 2017.

BENSON, R. E. et al. Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 177, n. 6, p. 1561-1566, jun. 1993.

BISHOP, N. et al. Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates. **The Journal of Cell Biology**, v. 157, n. 1, p. 91-101, apr. 2002.

BISSIG, C. et al. Viral infection controlled by a calcium-dependent lipid-binding module in ALIX. **Developmental cell**, v. 25, n. 4, p. 364-373, may. 2013.

- BISSIG, C.; GRUENBERG, J. ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland. **Trends in Cell Biology**, v. 24, n. 1, p. 19-25, jan. 2014.
- BONIFACINO, J. S. Adaptor proteins involved in polarized sorting. **The Journal of Cell Biology**, v. 204, n. 1, p.7-17, jan. 2014.
- BRESNAHAN, P.A. et al. A dileucine motif in HIV-1 Nef acts as an internalization signal for CD4 downregulation and binds the AP-1 clathrin adaptor. **Current Biology**, v. 8, n. 22, p. 1235–1238, nov. 1998.
- CAMPBELL, E. M.; HOPE, T. J. HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n.8, p.471-483, aug. 2015.
- CASANOVA, J. E. Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors. **Traffic**, v. 8, n. 11, p. 1476-1485, nov. 2007.
- CHAUDHURI, R. et al. Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent on clathrin and involves direct interaction of Nef with the AP2 clathrin adaptor. **Journal of Virology**, v.81, n.8, p.3877-3890, apr. 2007.
- CHOWERS, M. Y. et al. Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. **Journal of Virology**, v. 68, n. 5, p. 2906-2914, may. 1994.
- COSTES, S. V. et al. Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. **Biophysical Journal**, v. 86, n. 6, p. 3993-4003, jun. 2004.
- CRAIG, H. M. et al. Interactions of HIV-1 nef with the mu subunits of adaptor protein complexes 1, 2, and 3: role of the dileucine-based sorting motif. **Virology**, v. 271, n. 1, p. 9-17, may. 2000.
- DAI, W. et al. A long cytoplasmic loop governs the sensitivity of the anti-viral host protein SERINC5 to HIV-1 Nef. **Cell Reports**, v. 22, n. 4, p. 869-875, jan. 2018.
- DACOSTA, L. J. et al. Interactions between SIVNef, SIVGagPol and Alix correlate with viral replication and progression to AIDS in rhesus macaques. **Virology**, v. 394, n. 1, p. 47-56, nov. 2009.
- DASILVA, L. L. et al. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein targets CD4 to the multivesicular body pathway. **Journal of Virology**, v. 83, n. 13, p. 6578-6590, jul. 2009.
- DEEKS, S. G. et al. HIV infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 15035, n. 2015, oct. 2015.
- DIRK, B. S. et al. Viral bimolecular fluorescence complementation: a novel tool to study intracellular vesicular trafficking pathways. **PLoS One**, v. 10, n. 4, apr. 2015.
- DIRK, B. S. et al. HIV-1 Nef sequesters MHC-I intracellularly by targeting early stages of endocytosis and recycling. **Scientific Reports**, v. 6, p. 37021, nov, 2016.

DONALDSON, J. G.; WILLIAMS, D. B. Intracellular assembly and trafficking of MHC class I molecules. **Traffic**, v. 10, n. 12, p. 1745-1752, feb. 2009.

DORAY, B. et al. The gamma/sigma1 and alpha/sigma2 hemicomplexes of clathrin adaptors AP-1 and AP-2 harbor the dileucine recognition site. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, n. 5, p.1887-1896, may. 2007.

ERDTMANN, L. et al. Two independent regions of HIV-1 Nef are required for connection with the endocytic pathway through binding to the mu 1 chain of AP1 complex. **Traffic**, v. 1, n. 11, p. 871-883, nov. 2000.

FREED, E. O. HIV-1 assembly, release and maturation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 8, p. 484-496, aug. 2015.

GREENBERG, M. et al. A dileucine motif in HIV-1 Nef is essential for sorting into clathrin-coated pits and for downregulation of CD4. **Current Biology**, v. 8, n. 22, p. 1239–1242, nov. 1998.

GUO, X. et al. The adaptor protein-1 μ 1B subunit expands the repertoire of basolateral sorting signal recognition in epithelial cells. **Developmental cell**, v. 27, n.3, p. 353-366, nov. 2013.

HENNE, W. M. et al. The ESCRT pathway. **Developmental Cell**, v. 21, n. 1, p. 77-91, jul. 2011.

HURLEY, J. H.; HANSON, P. I. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 11, n. 8, p. 556-566, jun. 2010.

INUZUKA, M. et al. Serinc, an activity-regulated protein family, incorporates serine into membrane lipid synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 42, p. 35776-35783, oct. 2005.

JAKOBSDOTTIR, G. M. et al. On the Whereabouts of HIV-1 Cellular Entry and Its Fusion Ports. **Trends in Molecular Medicine**, v. 23, n. 10, p. 932-944, sep. 2017.

JANVIER, K. et al. HIV-1 Nef stabilizes the association of adaptor protein complexes with membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8725-8732, mar. 2003a.

JANVIER, K. et al. Recognition of dileucine-based sorting signals from HIV-1 Nef and LIMP-II by the AP-1 gamma-sigma1 and AP-3-sigma3 hemicomplexes. **Journal of Cell Biology**, v. 163, n. 6, p. 1281-1290, dec. 2003b.

JOVIC, M. et al. The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. **Histology and histopathology**, v. 25, n. 1, p. 99, jan. 2010.

- KERPPOLA, T. K. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. **Annual Review of Biophysics**, v. 37, p. 465-487, 2008.
- KONG, R. et al. Fusion peptide of HIV-1 as a site of vulnerability to neutralizing antibody. **Science**, v.352, n.6287, p.828-833, may. 2016.
- LAMA, J. The physiological relevance of CD4 receptor down-modulation during HIV infection. **Current HIV research**, v. 1, n. 2, p. 167-184, apr. 2003.
- LASKEY, S. B.; SILICIANO, R. F. A mechanistic theory to explain the efficacy of antiretroviral therapy. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 11, p.772-780, nov. 2014.
- LE GALL, S. et al. Nef interacts with mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. **Immunity**, v. 8, n. 4, p. 483-495, apr. 1998.
- LEE, I. et al. Binding of cargo sorting signals to AP-1 enhances its association with ADP ribosylation factor 1-GTP. **The Journal of Cell Biology**, v. 180, n. 3, p. 467-472, feb. 2008.
- LINDWASSER, O. W. et al. A diacidic motif in human immunodeficiency virus type 1 Nef is a novel determinant of binding to AP-2. **Journal of Virology**, v. 82, p. 1166-74, 2008.
- LUBBEN, N. B. et al. HIV-1 Nef-induced down-regulation of MHC class I requires AP-1 and clathrin but not PACS-1 and is impeded by AP-2. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, n. 9, p. 3351-3365, sep. 2007.
- MACDONALD, M. L. et al. Identifying off-target effects and hidden phenotypes of drugs in human cells. **Nature Chemical Biology**, v. 2, n. 6, p. 329-337, jun. 2006.
- MATHESON, N. J. et al. Cell surface proteomic map of HIV infection reveals antagonism of amino acid metabolism by Vpu and Nef. **Cell Host & Microbe**, v. 18, n. 4, p. 409-423, oct. 2015.
- MATTERA, R. Conservation and diversification of dileucine signal recognition by adaptor protein (AP) complex variants. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 3, p. 2022-2030, jan. 2011.
- MELLORS, J. W. et al. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. **Science**, v. 272, n. 5265, p. 1167-1170, may. 1996.
- MILLER, M. D. et al. The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 179, p. 101-113, 1994.
- MOTLEY, A. et al. Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 162, n. 5, p. 909-918, sep. 2003.

- MURRELL, B. et al. The evolutionary histories of antiretroviral proteins SERINC3 and SERINC5 do not support an evolutionary arms race in primates. **Journal of Virology**, v. 90, n. 18, p. 8085-8089, aug. 2016.
- NAHMIAS, A. J. et al. Evidence for human infection with an HTLV III/LAV-like virus in Central Africa, 1959. **The Lancet**, v. 327, n. 8492, p. 1279-1280, 1986.
- NIU, T. K. et al. Dynamics of GBF1, a Brefeldin A-sensitive Arf1 exchange factor at the Golgi. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. 3, p. 1213-1222, mar. 2005.
- NOVIELLO, C. M. et al. Cooperative binding of the class I major histocompatibility complex cytoplasmic domain and human immunodeficiency virus type 1 Nef to the endosomal AP-1 complex via its μ subunit. **Journal of virology**, v. 82, n. 3, p. 1249-1258, feb, 2008.
- PACZKOWSKI, J. E. et al. Cargo adaptors: structures illuminate mechanisms regulating vesicle biogenesis. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 7, p. 408-416, jul. 2015.
- PEREIRA, E. A.; DASILVA, L. L. HIV-1 Nef: taking control of protein trafficking. **Traffic**, v.17, n.9, p.976-996, sep. 2016.
- PETERLIN, B. M.; TRONO, D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 2, p.97-107, feb. 2003.
- PIGUET, V. Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the mu chain of adaptor complexes. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 9, p. 2472–2481, may. 1998.
- PIZZATO, M. et al. 644 2007. Dynamin 2 is required for the enhancement of HIV-1 infectivity by Nef. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 16, p. 6812-6817, apr. 2007.
- RAIBORG, C.; STENMARK, H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 445-452, mar. 2009.
- ROBINSON, M. S. Forty years of clathrin-coated vesicles. **Traffic**, v. 16, n. 12, p. 1210-1233, dec. 2015.
- ROSA, A. et al. HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. **Nature**, v. 526, n. 7572, p. 212-217, oct. 2015.
- SCHMIDT, O.; TEIS, D. The ESCRT machinery. **Current Biology**, v. 22, n. 4, p. R116-R120, feb, 2012.
- SCHNEIDER, C. A. et al. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.

SCHULTE, B. et al. Localization to detergent-resistant membranes and HIV-1 core entry inhibition correlate with HIV-1 restriction by SERINC5. **Virology**, v. 515, p. 52-65, feb, 2018.

SCHWARTZ, O. et al. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. **Nature medicine**, v. 2, n. 3, p. 338-342, 1996.

SHI, J. et al. HIV-1 Nef antagonizes SERINC5 restriction by downregulation of SERINC5 via the endosome/lysosome system. **Journal of Virology**, mar. 2018.

SOLIMAN, M. Mechanisms of HIV-1 control. **Current HIV/AIDS Reports**, v. 14, n. 3, p. 101-109, jun, 2017.

SOOD, C. et al. SERINC5 protein inhibits HIV-1 fusion pore formation by promoting functional inactivation of envelope glycoproteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 14, p. 6014-6026, apr. 2017.

STAMNES, M. A.; ROTHMAN, J. E. The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. **Cell**, v. 73, n. 5, p. 999-1005, jun. 1993.

SUGDEN, S. M. et al. Remodeling of the host cell plasma membrane by HIV-1 Nef and Vpu: a strategy to ensure viral fitness and persistence. **Viruses**, v. 8, n. 3, mar. 2016.

TAVARES, L. A. et al. CD4 down-regulation by HIV-1 Nef reveals distinct roles for $\gamma 1$ and $\gamma 2$ subunits of AP-1 complex in protein trafficking. **Journal of Cell Science**, v. 130, n. 2, p. 429-443, jan. 2017.

TRAUTZ, B. et al. The Antagonism of HIV-1 Nef to SERINC5 particle infectivity restriction involves the counteraction of virion-associated pools of the restriction factor. **Journal of Virology**, v. 90, n. 23, p. 10915-10927, nov. 2016.

USAMI, Y. et al. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. **Nature**, v. 526, n. 7572, p. 218-223, oct. 2015.

ZHANG, X. Identification of SERINC5-001 as the predominant spliced isoform for HIV-1 restriction. **Journal of Virology**, v. 91, n. 10, apr. 2017.

WAHEED, A. A. Host-Pathogen Interactions of Retroviruses. **Molecular Biology International**, v. 2012, oct. 2012.

WANDINGER-NESS, A.; ZERIAL, M. Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 11, oct. 2014.

WEGNER, C. S. et al. ESCRT proteins and cell signalling. **Traffic**, v. 12, n. 10, p. 1291-1297, oct. 2011.

WONDERLICH, E. R. et al. The tyrosine binding pocket in the adaptor protein 1 (AP-1) μ 1 subunit is necessary for Nef to recruit AP-1 to the major histocompatibility complex class I cytoplasmic tail. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 6, p. 3011-3022, feb. 2008.

WOODCOCK, D. M. et al. Quantitative evaluation of Escherichia coli host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 9, p. 3469-3478, may. 1989.

WOODMAN, P. G. Biogenesis of the sorting endosome: the role of Rab5. **Traffic**, v. 1, n. 9, p. 695-701, sep. 2000.

WYROZUMSKA, P. et al. Novel effects of Brefeldin A (BFA) in signaling through the insulin receptor (IR) pathway and regulating FoxO1-mediated transcription. **Cell Logistics**, v. 4, n. 1, jan. 2014.