CINTHIA DE LIMA ARAUJO

Identificação do conjunto de proteínas celulares que interagem com a proteína M2-1, e com o complexo M2-1, N e P do vírus Respiratório Sincicial Humano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção de título de mestre em Ciências.

São Paulo
2018

CINTHIA DE LIMA ARAUJO

Identificação do conjunto de proteínas celulares que interagem com a proteína M2-1, e com o complexo M2-1, N e P do vírus Respiratório Sincicial Humano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Armando Morais Ventura

Versão original

São Paulo
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Araujo, Cinthia de Lima
Identificação do conjunto de proteínas celulares que interagem com a proteína M2-1, e com o complexo M2-1, N e P do vírus Respiratório Sincicial Humano. / Cinthia de Lima Araujo; orientador Prof. Dr. Armando Morais Ventura. -- São Paulo, 2018.
89 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Vírus Respiratório Sincicial Humano. 2. Interação proteína-proteína. 3. M2-1. 4. YBX3. 5. PABPC1. I. Ventura, Prof. Dr. Armando Morais, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Cinthia de Lima Araujo

Titulo da Dissertação: Identificação do conjunto de proteínas celulares que interagem com a proteína M2-1, e com o complexo M2-1, N e P do Vírus Respiratório Sincicial Humano.

Orientador: Prof. Dr. Armando Morais Ventura

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou a candidata:

( ) Aprovada **( ) Reprovada**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura:.....
Nome: .....
Instituição: .....

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **767/2015** referente ao projeto intitulado: "*Identificação do conjunto de proteínas celulares interagentes com as proteínas M2-1, N e P do Vírus Respiratório Sincicial Humano*" sob a responsabilidade de Cinthia de Lima Araújo e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Armando Morais Ventura,** do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 06 de outubro de 2015

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo M. A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP

AGRADECIMENTOS

À minha família, Wilson, Vicentina, Gisele e Junior, por todo o apoio, incentivo, carinho e paciência, em todos os altos e baixos que se apresentaram nessa jornada.

Ao professor Dr. Armando, por ter me recebido em seu laboratório e assim contribuído de forma imensurável com o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos amigos que conheci no laboratório, Andressa, Bia, Dino, Juliana, Orlando, Laís, Stephanie e Tabata, pela convivência e suporte aos experimentos.

Ao Dr. Jean-François Eléouët, por ter me recebido em seu laboratório no Institut National de La Rechérche Agronomique, Jouy-en-Josas, França, por três meses. Também agradeço ao colegas Charles-Adrien, Hortense, Marie, Monika, Sergey e também aos demais colegas do Instituto, pelo suporte aos experimentos realizados.

Aos colegas de departamento do ICB, em especial aos professores Dr. Luiz Carlos, Dr. Giuseppe Palmisano, Dr. Carlos Menck que, juntamente com os seus respectivos grupos de trabalho, sempre foram dispostos a colaborar com os trabalhos desenvolvidos.

À Gisele, por toda a paciência e boa vontade em solucionar todas as necessidades relativas à secretaria.

Aos colegas que, juntamente comigo, organizaram o Curso de Inverno em Microbiologia e Biologia Molecular nos anos de 2016 e 2017.

Aos meus amigos Emmanuel, Fábio, Jeremy, Jussara e Priscila, que sempre me apoiaram em vários momentos, apesar da distância constante.

À Samara, por me promover a possibilidade de aprender muito, através da terapia, sobre o poder transformador que o autoconhecimento traz às nossas vidas.

AGRADECIMENTO AS AGÊNCIAS DE FOMENTO

À CAPES pela bolsa concedida (NUSP 7103265).

À FAPESP pelo apoio financeiro (Processo 2013/50299-2).

“Fortes Fortuna Juvat”

Autor desconhecido

RESUMO

ARAUJO, C. L. **Identificação do conjunto de proteínas celulares que interagem com a proteína M2-1, e com o complexo M2-1, N e P do Vírus Respiratório Sincicial Humano.** 2018. 92 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O Vírus Respiratório Sincicial Humano, do inglês *human Respiratory Syncytial Virus* (hRSV), é uma das maiores causas de doenças respiratórias agudas, principalmente em crianças e bebês entre seis meses e dois anos de idade. Não há drogas eficazes ou vacina aprovada até o momento para esse vírus, apesar das décadas de intensa pesquisa e grande quantidade de dados sobre ele acumulados. O genoma do hRSV codifica onze proteínas e a compreensão das interações entre essas proteínas virais e as proteínas do hospedeiro é essencial para que possíveis alvos terapêuticos contra o hRSV sejam identificados. No laboratório, anteriormente, foi dado enfoque às interações entre as proteínas celulares e as proteínas virais de matriz (M), nucleoproteína (N) e fosfoproteína (P). Neste trabalho, analisamos as interações da proteína viral M2-1 (cofator essencial para a transcrição) através da mesma estratégia utilizada naqueles experimentos, de fusão a FLAG (gerando FLAG-M2-1) e imunoprecipitação com anticorpos contra esse peptídeo. As proteínas co-imunoprecipitadas, identificadas por espectrometria de massas, foram: *poly(A)-binding protein cytoplasmic 1* (PABPC1), *Y-box binding protein 3* (YBX3), e *Nuclease-sensitive element-binding protein 1* (YBX1). M2-1 é capaz de integrar-se ao complexo chamado de semelhante a corpúsculos de inclusão (*IB like*, do inglês), formado por N e P, que é similar estruturalmente aos corpúsculos de inclusão encontrados em células infectadas (*IBs*). Essa propriedade foi usada para analisar que proteínas celulares seriam recrutadas para esse outro nível de organização dessas três proteínas virais, envolvidas na transcrição. O complexo FLAG-N/P/M2-1 co-imunoprecipitou as proteínas celulares: Hsp70, Hsp90 (*Heat shock proteins 70* e *90*), Npm (*Nucleophosmin*), que podemos agrupar como chaperonas; PABPC1, YBX1, YBX3, ligantes de RNA; e sub-unidade pICIn do metilossomo, associada a modificação pós-tradução. Detalhamos a análise para YBX3, obtendo evidências adicionais de sua interação com M2-1 em ensaios de complementação de proteína fragmentada (*Split-NanoLuc*), e de co-localização por imunofluorescência indireta. Finalmente, utilizamos a metodologia de expressão em bactérias para demonstrar a interação entre M2-1 e os domínios funcionais de PABPC1, porém esses ensaios não foram conclusivos.

Palavras-chave: Vírus Respiratório Sincicial Humano. Interação proteína-proteína. M2-1. YBX3. PABPC1.

ABSTRACT

ARAUJO, C. L. **Identifying the set of cellular proteins that interact with the protein M2-1, and with the complex M2-1, N and P of Human respiratory syncytial virus.** 2018. 92 p. Dissertation (Master in Microbiology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Human Respiratory Syncytial Virus (hRSV) is one of the leading causes of acute respiratory diseases, especially in children and infants between six months and two years of age. There is no effective drug or vaccine approved so far for this virus, despite decades of intensive research and large amount of data on it. The genome of hRSV encodes 11 proteins and the understanding of the interactions between these viral proteins and host proteins is essential to identify possible therapeutic targets against hRSV. In the lab, previously, was given focus to the interactions between cellular proteins and viral proteins matrix (M), nucleoprotein (N) and phosphoprotein (P). In this paper, we analyze the viral M2-1 (cofactor essential for transcription) protein interactions through the same strategy used in those experiments: fusion with FLAG (generating FLAG-M2-1) and immunoprecipitation with antibodies against this peptide. The co-immunoprecipitated proteins, identified by mass spectrometry, were: Poly (A)-binding protein cytoplasmic 1 (PABPC1), Y-box binding protein 3 (YBX3), and Nuclease-sensitive element-binding protein 1 (YBX1). M2-1 is able to integrate the complex called similar to inclusion bodies (IB like), formed by N and P, which is similar structurally to the inclusion bodies found in infected cells (IBs). This property has been used to analyze which cellular proteins would be recruited for this new level of organization of these three viral proteins involved in transcription. The cellular proteins co-immunoprecipitated with the complex FLAG-N/P/M2-1, were: Hsp70, Hsp90 (Heat shock proteins 70 and 90), Npm (Nucleophosmin), that we can group as chaperones; PABPC1, YBX1, YBX3, RNA ligands; and the methylosome sub-unit pICIn, post-translational modification-associated. We detailed the analysis for YBX3, obtaining additional evidence of its interaction with M2-1 in fragmented protein complementation tests (Split-NanoLuc), and co-localization by indirect immunofluorescence. Finally, we used the methodology of expression in bacteria to demonstrate the interaction between M2-1 and functional domains of PABPC1, but these tests were not conclusive.

Keywords: Human Respiratory Syncytial Virus. Protein-protein interaction. M2-1. YBX3. PABPC1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do genoma do hRSV, cepa A2. 2
Figura 2. Esquema da estrutura da partícula viral do hRSV. 2
Figura 3. Representação esquemática da arquitetura de um vírus hRSV. 3
Figura 4. Infecção de células epiteliais das vias aéreas pelo hRSV. 5
Figura 5. Estrutura da proteína M2-1 do hRSV resolvida por cristalografia. 7
Figura 6. Representação em 3D da proteína N do hRSV. 10
Figura 7. Representação da estrutura primária da proteína P. 11
Figura 8. Diagrama da estrutura molecular do CSD de YBX1 de *Bacillus subtilis*. 12
Figura 9. Os domínios das PABP's. 15
Figura 10. Mapa do vetor pcDNA3-FLAG. 19
Figura 11. Representação da Construção pcDNA3-FLAG-M2-1. 20
Figura 12. Mapa do vetor pCI-neo. 25
Figura 13. Representação da construção do vetor pCI-neo-HA-YBX3-11S-CT. 26
Figura 14. Mapa do vetor pCI. 28
Figura 15. Representação da construção do vetor pCI-HA-YBX3-YFP1. 28
Figura 16. Representação da construção do vetor pCI-M2-1-YFP2. 29
Figura 17. Mapa do vetor pGEX-4T-3. 32
Figura 18. Representação esquemática do vetor pGEX-GST-D1. 32
Figura 19. Representação esquemática do vetor pGEX-GST-D2-3. 33
Figura 20. Representação esquemática do vetor pGEX-GST-MELLE. 33
Figura 21. Análise da digestão do plasmídeo pcDNA-FLAG-M2-1. 35
Figura 22. Análise por Western blot da expressão da proteína FLAG-M2-1. 36
Figura 23. Imunofluorescência da expressão das proteínas FLAG-M2-1, N e P. 37
Figura 24. Imunofluorescência da co-expressão das proteínas N e P. 38
Figura 25. Imunofluorescência da co-expressão das proteínas FLAG-M2-1, N e P. 39
Figura 26. Digestão da construção pHA-YBX3-11S-CT. 46
Figura 27. Intensidade de luminescência em ensaio de *Split-NanoLuc* 47
Figura 28. Intensidade de luminescência em ensaio de *Split-NanoLuc* com maior diversidade de interações. 47
Figura 29. Digestão da construção pYFP2-M2-1. 48
Figura 30. Imunofluorescência da co-expressão das proteínas HA-YBX3 e M2-1-YFP2 49

Figura 31. Imunofluorescência da co-expressão das proteínas HA-YBX3-YFP1, N e P. 49
Figura 32. Imunofluorescência da co-expressão das proteínas HA-YBX3-YFP1, M2-1-YFP2, N e P. 50
Figura 33. Imunofluorescência da expressão das proteínas HA-YBX3, M2-1, N e P em células BEAS-2B. 51
Figura 34. Análise do plasmídeo pGEX-GST-D1. 52
Figura 35. PCR feita a partir das construções pGEX-GST-D2-3 e pGEX-GST-MELLE. 52
Figura 36. Expressão dos domínios da PABP e da YBX3 em BL21, efeito da RNase. 53
Figura 37. Expressão dos domínios da PABP em BL21, com e sem RNase e posterior incubação com a M2-1 purificada. 54
Figura 38. Expressão e co-expressão dos domínios da PABP e pET-28-M2-1 em BL21, amostras sonicadas. 55
Figura 39. Co-expressão dos domínios da PABP e pET-28-M2-1 em BL21, pull down na presença de NaCl 1M. 56
Figura 40. Co-expressão dos domínios da PABP e pET-28-M2-1 em BL21, pull down na ausência de NaCl 1M. 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação por espectrometria de massas das proteínas celulares co-imunoprecipitadas com FLAG-M2-1 (análise feita pelo CEFAP). 40
Tabela 2. Identificação por espectrometria de massas das proteínas celulares co-imunoprecipitadas com FLAG-M2-1 (análise feita pela Central Analítica). 41
Tabela 3. Identificação por espectrometria de massas das proteínas celulares co-imunoprecipitadas com M2-1-FLAG-CT. 42
Tabela 4. Identificação por espectrometria de massas das proteínas celulares co-imunoprecipitadas com FLAG-N. 43
Tabela 5. Identificação por espectrometria de massas das proteínas celulares co-imunoprecipitadas com FLAG-P. 43
Tabela 6. Identificação por espectrometria de massas das proteínas celulares co-imunoprecipitadas com FLAG-N, P e M2-1. 45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA - *Bovine serum albumin*

C-arm - C-terminal da N

Clns1a - Sub-unidade pIcln do metilossomo

CSD - Domínio *cold shock*

DNA - Ácido desoxirribonucléico

D1 - Domínio 1 da PABPC1, correspondente ao domínio RRM1

D2-3 - Domínios 2 e 3da PABPC1, correspondentes aos domínios RRM2 e 3 juntos

FLAG - Peptídeo FLAG

GE - *Gene end*

GS - *Gene start*

GS Beads - Glutathione Sepharose Beads

GST - *Glutathione S-transferase*

HEK293T - *Human embryonic kidney expressing T antigen*

HEp-2 - *HeLa derivative cell line human*

HA-tag - Human influenza hemagglutinin tag

His-tag - Polyhistidine tag

HRSV - Vírus respiratório sincicial humano

Hsp70 - *Heat shock protein 70*

Hs90 - *Heat shock protein 90*

IB's - Inclusion bodies

IB like - Inclusion Bodie Like

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses

LB - Luria-Bertani

MELLE - Domínio *Mademoiselle* da PABPC1, correspondente ao domínio globular PABC

MEP-50 - *Methylosome protein 50*, também conhecida como WDR77

mRNA - RNA mensageiro

N-arm - N-terminal da N

N_{CTD} - Domínio C-Terminal da N

NLR - Taxa de fluorescência normalizada

N_{NTD} - Domínio N-terminal da N

NPM - Nucleofosmina

ORFs - *Open reading frames*

PABPC1 - *Poly(A)-binding protein cytoplasmic 1*

PABP3 - *Poly(A)-binding protein 3*

PABP's - *Poly(A)-binding proteins*

PBS - *Phosphate buffered saline*

PCR - *Polymerase chain reaction*

pICln - Sub-unidade pIcln do metilossomo, também conhecida como Clns1a

PRMT5 - Proteína arginina metil transferase-5

Prm1 - Protamina 1

Prm2 - Protamina 2

RdRp - *RNA-dependent RNA polymerase*

RNA - Ácido Ribonucléico

RNP - Complexo ribonucleoprotéico

RNase - Ribonuclease

Rpm - Rotações por minuto

RRM's - Domínios de reconhecimento de RNA

SDS - *Dodecil Sulfato de Sódio*

SDS-PAGE - *Dodecil Sulfato de Sódio - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*

siRNA - Small interfering RNA

Split-NanoLuc - Ensaio de complementação de luciferase dividida

snRNPs - *Small nuclear ribonucleoproteins*

TBS - Tris buffered saline

WDR77 - proteína que contém 77 repetições de WD, também conhecida como *methylosome protein 50*

YBP's - *Y-box proteins*

YBX1 - *Y-box binding protein 1*

YBX3 - *Y-box binding protein 3*

YFP - *Yellow Fluorescent Protein*

ZBD - *Zinc-binding domain*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
1.1 O Vírus Respiratório Sincicial Humano 1
1.2 Estrutura e genoma viral 1
1.3 Infecção e ciclo replicativo 4
1.4 Epidemiologia 5
1.5 Dados anteriores do laboratório 6
1.6 As principais proteínas celulares e virais abordadas nesse estudo *7*
1.6.1 A proteína M2-1 ..... *7*
1.6.2 A nucleoproteína N 9
1.6.3 A fosfoproteína P 10
1.6.4 Proteínas YBX1 e YBX3 11
1.6.5 As poly-A binding proteins 14
2 OBJETIVOS 16
2.1 Objetivo geral 16
2.2 Objetivos específicos 16
3 MATERIAIS E MÉTODOS 17
3.1 Cepas de Escherichia coli 17
3.2 Otimização de códons e plasmídeos utilizados 17
3.3 Linhagens celulares 18
3.4 O vírus hRSV (cepa A2) 18
3.5 Construção do vetores pFLAG-M2-1, pShuttle-M2-1 e pM2-1-FLAG-CT 19
3.6 Análise dos clones 21
3.7 Western Blotting 21
3.8 Ensaio de imunofluorescência (FLAG-M2-1/ N/ P) 22
3.9 As imunoprecipitações com FLAG-beads 23
3.10 Digestão em Solução e análise por espectrometria de massas 23
3.11 Análise de complementação de luciferase dividida (Split-NanoLuc) para a interação entre M2-1 e YBX3 24
3.12 Construção do vetor pCI-neo-YBX3-11S-CT 25
3.13 Ensaio de Split-NanoLuc 26
3.14 Ensaios com a YFP (Yellow Fluorescent Protein) para caracterização da interação entre M2-1 e YBX3. 26
3.15 Construção dos vetores pM2-1-YFP2 e pHA-YBX3-YFP1 27
3.16 Ensaios de imunofluorescências (HA-YBX3-YFP1 e M2-1-YFP2 em HEp-2 e HA-YBX3 e

M2-1 em BEAS-2B) 29
3.17 Detecção de interação entre PABP, YBX3 e M2-1 in bacteria. 30
3.18 Construção dos vetores para a expressão de proteínas recombinantes in bacteria. 30
3.19 Construção do vetor pGEX-GST-HA-YBX3 33
3.20 Purificação e co-purificação de proteínas recombinantes expressas em E. coli ... 34
4 RESULTADOS 35
4.1 Construção do vetor FLAG-M2-1 35
4.2 Expressão da proteína FLAG-M2-1. 35
4.3 Análise da expressão das proteínas M2-1, N e P por imunofluorescência 36
4.4 Análises por espectrometria de massas (FLAG-M2-1) 40
4.5 Análises por espectrometria de massas (M2-1-FLAG-CT) 41
4.6 Análises por espectrometria de massas (FLAG-N) 42
4.7 Análises por espectrometria de massas (FLAG-P) 43
4.8 Análises por espectrometria de massas (FLAG-N, P e M2-1) 44
4.9 Construção dos vetores e ensaios de Split-NanoLuc 45
4.10 Construção dos vetores pM2-1-YFP2 e pHA-YBX3-YFP1 e ensaio de imunofluorescência indireta. 48
4.11 Construção de vetores com os domínios de PABPC1 51
4.12 Expressão de YBX3 ou dos domínios de PABPC1 em fusão com GST 52
4.13 Expressão e purificação dos domínios de PABP em fusão com a GST (com e sem RNAse) e incubação posterior com a M2-1 purificada. 53
4.14 Co-expressão dos domínios da PABP com M2-1 54
5 DISCUSSÃO 57
5.1 Expressão de M2-1 e análises por espectrometria de massas 57
5.2 Ensaios de Split-NanoLuc para a análise da interação entre M2-1 e YBX3 61
5.3 Ensaios de imunofluorescência para a análise da interação entre M2-1 e YBX3 ... 62
5.4 Interação entre PABPC1 e M2-1 expressas em bactérias 63
6 CONCLUSÕES 66
REFERÊNCIAS* 67

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Vírus Respiratório Sincicial Humano

O Vírus Respiratório Sincicial Humano (hRSV) foi isolado pela primeira vez em 1956 de um chimpanzé de cativeiro que apresentava sintomas semelhantes aos do resfriado comum, e posteriormente de crianças com doenças respiratórias em 1957 (MELERO, 2007). O hRSV pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Pneumovirinae*, gênero *Orthopneumovírus*, de acordo com as normas do *International Comitee on Taxonomy of Virus* (ICTV) (AFONSO et al., 2016) e é caracterizado por ser um vírus envelopado que possui como genoma uma molécula de RNA de fita simples não segmentada com polaridade negativa (COLLINS; MELERO, 2011).

Uma das principais causas de morte de crianças com menos de cinco anos no mundo todo é a infecção aguda do trato respiratório inferior, sendo o hRSV o principal patógeno responsável por hospitalizações associadas a esse quadro (OHNO et al., 2013; ZHANG et al., 2014). O hRSV também é um importante patógeno no desenvolvimento de doenças respiratórias em idosos e imunocomprometidos (SHAPIRO et al., 2014).

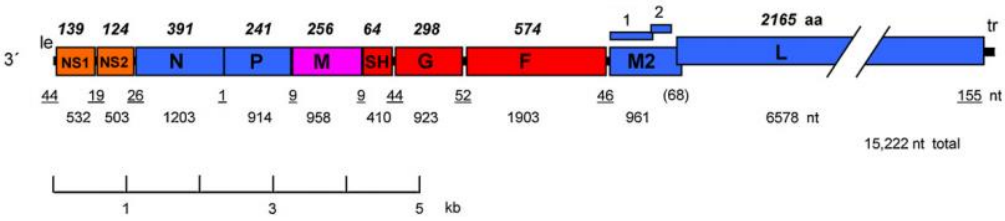
O hRSV induz a infecção aguda do trato respiratório inferior com uma variedade de manifestações tais como bronquiolite e pneumonia, que são acompanhadas por sintomas como tosse, chiado e desconforto respiratório (CANEDO-MARROQUIN et al., 2017).

Apesar disso, atualmente ainda não há vacinas aprovadas ou drogas eficientes disponíveis contra o hRSV (ZHANG et al., 2014).

1.2 Estrutura e genoma viral

O genoma do hRSV tem cerca de 15 kb, sendo constituído por 10 genes na ordem 3' NS1-NS2-N-P-M-SH-F-G-M2-L5' (Figura 1). Esses genes são transcritos em 10 mRNAs, sendo que para M2 existem duas *open reading frames* (ORFs) que se sobrepõe levando à tradução de dois polipeptídeos, M2-1 e M2-2 e consequentemente, o genoma codifica então 11 proteínas (COLLINS; MELERO, 2011). Na bicamada lipídica, que constitui o envelope viral, são encontradas a glicoproteína de ligação (anti-receptor G), a glicoproteína de fusão (F) e uma pequena glicoproteína transmembrana (SH) (FEARNS; COLLINS, 1999).

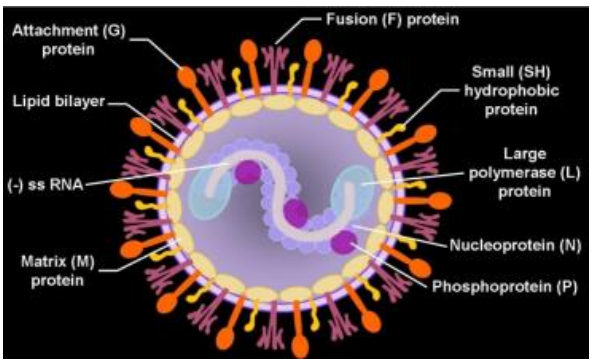
Figura 1. Mapa do genoma do hRSV, cepa A2.



Mapa do genoma do hRSV, cepa A2. Está apresentado o mapa do genoma, de sentido negativo, em que a sobreposição das ORF's de M2-1 e M2-2 está indicada acima do gene. Os números abaixo do mapa indicam o comprimentos em nucleotídeos (nt): os correspondentes da região 3' *leader* (le), da 5' *trailer* (tr) e das regiões intergênicas estão sublinhados, e o comprimento da sobreposição dos genes *M2* e *L* está entre parênteses. Números em negrito e itálico sobre o mapa indicam o comprimento em aminoácidos das proteínas. As proteínas virais estão representadas como: G, glicoproteína de fusão; F, glicoproteína de fusão; SH, pequena proteína hidrofóbica; M, proteína de matriz; N, nucleoproteína; P, fosfoproteína; L, polimerase; M2-1, produto da primeira ORF do mRNA M2; M2-2, produto da segunda ORF do mRNA M2; NS1, proteína não-estrutural 1; NS2, proteína não-estrutural 2. Fonte: COLLINS; MELERO, 2011.

Na Figura 2 está representada a partícula viral. Abaixo do envelope, na superfície interna da membrana, está a proteína de matriz (M), que tem papel importante na montagem do vírion ao formar uma ponte entre o nucleocapsídeo viral e o envelope (RODRIGUEZ et al., 2004; MELERO, 2007). Além de ser um componente estrutural do vírus, a M também inibe a transcrição ao fim do processo de replicação, quando ocorre o brotamento (MITRA et al., 2012).

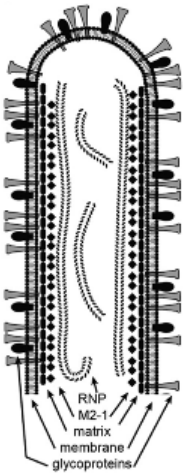
Figura 2. Esquema da estrutura da partícula viral do hRSV.



Esquema da estrutura da partícula viral. Fonte: *Rega Institute for Medical Research.*

Recentemente foi identificado que, na estrutura da partícula viral, a M2-1 está localizada entre a proteína M do vírus e o complexo ribonucleoproteico (Figura 3) (KISS et al., 2014).

Figura 3. Representação esquemática da arquitetura de um vírus hRSV.



Representação esquemática da arquitetura de um vírus hRSV. Estão representadas as glicoproteínas, a membrana viral, a camada da proteína M, a M2-1 (funcionando como *linker* com o RNP) e o RNP. Fonte: KISS et al., 2014.

O complexo ribonucleoprotéico (RNP) é formado pelo RNA viral complexado com a nucleoproteína N (ribonucleocapsídeo helicoidal), associado à fosfoproteína P, à proteína M2-1 e à principal unidade da polimerase viral, a proteína L. O RNP é responsável pela transcrição e replicação do genoma viral (SHAPIRO et al., 2014).

O genoma do hRSV também codifica três proteínas não estruturais (NS1, NS2 e M2-2), que são produzidas na célula infectada mas não são incorporadas na partícula viral. As proteínas NS1 e NS2 tem papel no bloqueio das vias de resposta e produção de interferon (PRETEL et al., 2013) e a M2-2 é uma proteína pequena, que se acumula durante a infecção e tem papel na transição da transcrição de mRNAs para a síntese de RNA genômico (COLLINS; MELERO, 2011).

A RNA polimerase RNA dependente (RdRp, do inglês *RNA-dependent RNA polymerase*) é composta de duas proteínas multifuncionais, a proteína L e a fosfoproteína P. Tal como todos os vírus com genoma de RNA fita simples não segmentado com polaridade negativa, atribui-se à L do hRSV a realização de todas as funções catalíticas tais como a síntese de RNA, o *capping*, a metilação e a poliadenilação. A proteína P é um fator de transcrição fundamental, que viabiliza a interação entre a L e o complexo RNA-N (FIX et al., 2011). A proteína M2-1 é um cofator também essencial, que aumenta a processividade da polimerase permitindo a transcrição sucessiva dos mRNAs virais e a replicação do genoma, tendo sido demonstrada sua interação tanto com o RNA viral quanto com P (BLONDOT et al., 2012).

Durante a replicação do hRSV é possível observar no citoplasma das células infectadas estruturas diferenciadas, os corpúsculos de inclusão (IBs, do inglês *inclusion bodies*). Há evidências de que as proteínas N, P, M2-1 e L, além do RNA viral, estão presentes nos IBs (GARCIA et al., 1993; MCDONALD et al., 2004; BROWN et al., 2005; CARROMEU et al., 2007), associando os processos de transcrição e replicação a essas estruturas. Foi mostrada também a associação de várias proteínas celulares à estrutura dos corpúsculos de inclusão (BROWN et al., 2005; RADHAKRISHNAN et al., 2010; LIFLAND et al., 2012), no entanto, a compreensão estrutural e funcional dos IBs ainda é pouco conhecida.

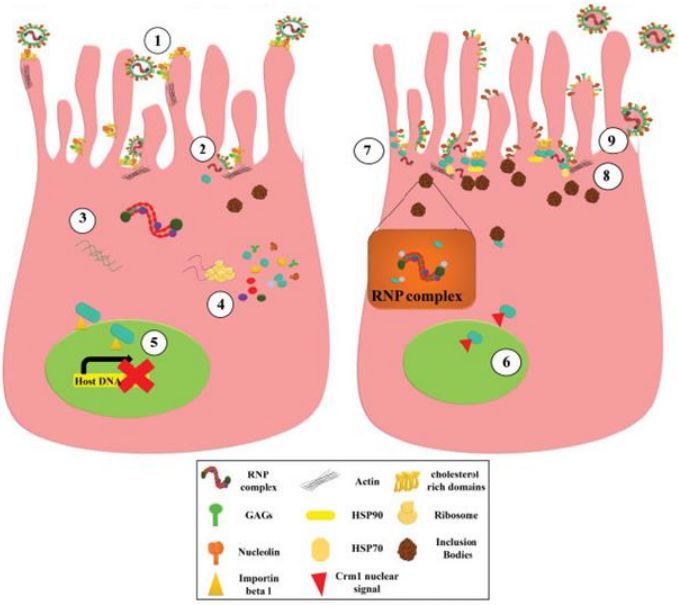
1.3 Infecção e ciclo replicativo

A entrada das partículas virais, nas células epiteliais das vias aéreas, ocorre através da ligação da proteína G, que aproxima o vírus da célula e permite o contato da proteína F viral com a nucleolina celular, promovendo a fusão do envelope do hRSV com a membrana da célula hospedeira (Figura 4-1) e a consequente liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma (Figura 4-2) (BOHMWALD et al., 2016) .

A transcrição do genoma viral, que ocorre nos corpúsculos de inclusão, é mediada pela polimerase L que, na presença de N, P e M2-1, transcreve os genes de forma sequencial. Devido à sua associação com a P, a L é capaz de reconhecer o promotor da região 3’ do RNA viral e iniciar a transcrição dos genes, de forma guiada pelos sinais curtos de *gene-start* e *gene-end*, com a adição do cap 5’ e sua metilação, e dapoliadenilação da região 3’,produzindo assim os mRNA’s individuais (Figura 4-4) (COLLINS, MELERO 2011; BOHMWALD et al., 2016).

A associação de P e M2-1, junto à L, contribui para a regulação da transcrição dos mRNA’s, e para a processividade da atividade polimerase (CANEDO-MARROQUIN et al., 2017).

Figura 4. Infecção de células epiteliais das vias aéreas pelo hRSV.



Infecção de células epiteliais da vias aéreas pelo hRSV. 1: As proteínas G e F interagem com os receptores das células hospedeiras para iniciar a entrada. 2: O complexo RNP é lançado, pela separação do RNP e de M. 3: Replicação do RNA viral. 4: Transcrição e tradução das proteínas virais. 5: A proteína M é importada para o núcleo e inibe a transcrição das células hospedeiras. 6: A M é exportada do núcleo e é transportada para os domínios ricos em colesterol. 7: A M começa a interagir com as proteínas de superfície e inicia a montagem. 8: o RNP interage com a M para finalizar o processo de montagem. 9: O brotamento das partículas virais nascentes. Fonte: BOHMWALD et al., 2016.

O complexo de ribossomos da célula hospedeira então traduz as proteínas a partir dos mRNA's virais e, após um acúmulo destas proteínas, passa a ocorrer uma mudança (com a ajuda da M2-2) na ação da polimerase Le esta então inicia a replicação do RNA (Figura 4-3), tendo em conta que L passa a ignorar os sinais de *gene-start* e *gene-end* e inicia a geração de cópias completas do RNA viral com a polaridade positiva. Utilizando a região *trailer* como promotor, na porção 3'do molde antigenoma de sentido positivo, a L replica o genoma completo de sentido negativo para a posterior montagem (Figura 4-7/8) e liberação das partículas virais (Figura 4-9) (COLLINS, MELERO 2011; GRIFFITHS et al., 2017).

1.4 Epidemiologia

O hRSV é um vírus altamente contagioso, que se espalha rapidamente através da inalação de gotículas contendo as partículas virais ou através do contato dessas gotículas com a mucosa ocular.Uma das principais características deste vírus é que ele pode infectar uma mesmo indivíduo diversas vezes ao longo da vida, sendo que estudos epidemiológicos

indicam que cerca de 36% dos indivíduos podem ser re-infectados durante uma temporada (BOHMWALD et al., 2016).

As infecções por hRSV ocorrem principalmente em surtos epidêmicos anuais, durante o inverno em países de clima temperado e durante a estação chuvosa em países tropicais. A maior parte das crianças, até o primeiro ano de vida, já foi infectada pelo hRSV e praticamente todas elas já foram infectadas ao atingirem os 2 anos de idade (COLLINS, MELERO, 2011; BOHMWALD et al., 2016).

Alguns estudos estimam que, de forma global, o hRSV gerou quase 34 milhões de casos de doenças do trato respiratório inferior no ano de 2005 em crianças menores de 5 anos, sendo que 10% delas necessitaram de hospitalização. Essas infecções geraram entre 66 mil e 199 mil mortes, com 99% desses óbitos ocorridos em países em desenvolvimento, evidenciando uma maior população de crianças e os recursos reduzidos nessas regiões (COLLINS; MELERO, 2011).

1.5 Dados anteriores do laboratório

Os genes virais N, P e M foram otimizados para a expressão eficiente em células de mamíferos e foram sub-clonados, de modo a ter essas proteínas expressas em fusão com o peptídeo FLAG (SIMABUCO et al., 2009; SIMABUCO, 2009; TAMURA, 2009). Isso possibilitou utilizar a técnica de co-imunoprecipitação das proteínas celulares associadas a essas proteínas virais com anticorpo anti-FLAG, seguida de espectrometria de massas. Foram selecionadas as proteínas identificadas que tiveram maior porcentagem de cobertura, para análises posteriores confirmatórias, por co-imunoprecipitação seguida de *western blotting* com anticorpos específicos.

As interações foram primeiro confirmadas utilizando transfecção com os vetores de expressão dos genes virais otimizados para expressão em células humanas, seguidas de imunoprecipitação com anti-FLAG, e detecção com anticorpos contra as proteínas celulares. Depois, extratos de células infectadas pelo vírus foram imunoprecipitados com os anticorpos contra as proteínas celulares identificadas, seguindo-se a detecção com anticorpos contra as proteínas virais. As interações confirmadas mostraram que a proteína N interage com a proteína do choque térmico Hsp70 e com as proteínas do metilossomo WDR77 e PRMT5; P interage com Hsp70 e com Tropomiosina; e M com as proteínas Nucleofosmina e Tropomiosina (OLIVEIRA et al., 2013). Neste estudo ampliamos as observações de interação hRSV-célula, utilizando a mesma estratégia para a proteína M2-1.

1.6 As principais proteínas celulares e virais abordadas nesse estudo

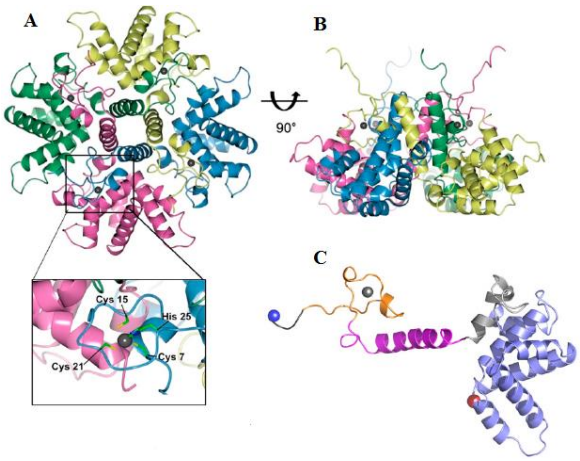
Ao considerar que as proteínas virais M2-1, N e P estão presentes nos *IB's*, onde ocorrem os processos de transcrição e replicação do vírus, pode-se afirmar que estas proteínas possuem um importante papel para a compreensão do ciclo viral e das possíveis interações proteína-proteína que ocorrem nessas estruturas (COLLINS, FEARNS,1999; MELERO, 2007).

As proteínas *Y-box binding protein* 1 (YBX1), *Y-box binding protein 3* (YBX3), *poly(A)-binding protein cytoplasmic 1* (PABPC1) e *poly(A)-binding protein cytoplasmic 1* (PABPC4) foram identificadas nos experimentos iniciais de co-imunoprecipitação com M2-1 que realizamos e, por conta disso, optou-se por focar principalmente nessas proteínas para a realização dos demais experimentos ao longo do trabalho, como será discutido no item resultados.

1.6.1 A proteína M2-1

A proteína M2-1 possui 194 aminoácidos e forma um tetrâmero estável em solução (Figura 5). Esta proteína possui 4 domínios principais, sendo o N-terminal composto por um domínio de ligação ao zinco, do inglês, *zinc-binding domain* (ZBD), um domínio de oligomerização em alfa-hélice, um *core domain* (resíduos ~ 58- 177) e um C-terminal não-estruturado (TANNER et al., 2014; TANG et al., 2001).

Figura 5. Estrutura da proteína M2-1 do hRSV resolvida por cristalografia.



Estrutura da proteína M2-1 do hRSV resolvida por cristalografia. Modelo de tetrâmero com o N-terminal em destaque (A) e vista lateral (B). A M2-1 monomérica (C) é representada em diferentes cores: o ZBD em laranja, o domínio de oligomerização em magenta, o *core domain* em azul, o domínio não estruturado em cinza e os resíduos do vetor de clonagem em preto. Fonte: TANNER et al., 2014.

A M2-1 é reconhecida, de forma geral, como um cofator de anti-terminação da transcrição que previne o término prematuro do processo de transcrição e também promove o início da transcrição nas junções entre os genes, atuando juntamente com a polimerase viral (TANG et al., 2001).

Através de experimentos com mini-replicons, foi identificado que a região correspondente ao *zinc-binding domain* (resíduos 7 até 25, também reconhecido como *Cys_3-His_1motif*) é essencial para a função da proteína, e consequentemente para a infectividade do vírus. Além disso, através de análise de mutantes com deleções, ficou reconhecido que a região N-terminal é importante para o dobramento da proteína (MELERO, 2007).

Também foi constatado, através de experimentos de minigenoma com mutantes, a importância da presença de 3 resíduos de cisteínas altamente conservados no N terminal, sem os quais não foi possível obter vírus viáveis após a experimentação, demonstrando a importância desses resíduos para a função da M2-1 e para a replicação do hRSV (TANG et al., 2001).

Experimentos em células infectadas com o hRSV e em células transfectadas com vetores de expressão, mostraram que a M2-1 é co-imunoprecipitada com N. Essa interação aparentemente ocorre via RNA, pois o experimento foi sensível à presença de RNase (CARTEE; WERTZ, 2001), sendo que outros estudos identificaram que M2-1 se liga através de seu ZBD, aos mRNAs gerados durante a infecção, sem especificidade (MELERO, 2007).

A estrutura da M2-1 mostra que o *core domain*, onde ocorre a ligação ao RNA, é uma região flexível onde há dois resíduos de serina fosforilados durante a infecção, sendo que a capacidade de ligação de M2-1 ao RNA aparenta ser dependente dessa fosforilação (BAILLY et al., 2016; TANG et al., 2001).Também é através do seu *core domain* que a M2-1 se liga a P, porém, essa ligação ocorre de forma competitiva, já que o RNA também pode se ligar a este (BAILLY et al., 2016).

É reconhecido que a região que faz uma ponte (resíduos 57 a 62) entre o domínio de tetramerização e o *core domain*, também possui dois resíduos de serinas (58 e 61) que são fosforilados durante a infecção. Através de experimentos feitos com mutantes pela substituição por adeninas ou por aspartatos (“fosfomiméticos”), demonstrou-se que esses resíduos são essenciais para a função de antiterminação de síntese de mRNA da M2-1. Assim, a mudança no estado de fosforilação de M2-1, influencia tanto na sua interação com outros ligantes, quanto na sua ação antiterminação (TANNER et al., 2014).

As regiões C terminal das proteínas M2-1 dos pneumovírus são heterogêneas nas sequências e nos comprimentos, indicando um papel menos essencial ao C-terminal dessas

proteínas. Experimentos de minigenoma, onde foram utilizadas construções com a deleção de diferentes quantidades de aminoácidos (67, 46 ou 17 aminoácidos) da região C terminal da M2-1, demonstraram que as proteínas truncadas com 46 e 67 aminoácidos não permitiram a eficiente síntese do comprimento total do mRNA com o gene repórter da β-galactosidade. Também não foi possível a recuperação de vírus viáveis nessas condições (TANG et al., 2001).

As proteínas N, P, L e o RNA viral são os componentes virais necessários para a replicação virale a transcrição requer a ação coordenada das proteínas N, P, L, M2-1 sobre o RNA viral (COLLINS; FEARNS,1999; MELERO, 2007). Desta forma, é reconhecido que a proteína M2-1 não é requerida para a replicação do genoma viral, porém é de extrema importância para a transcrição dos mRNAs virais. Estudos *in vitro* demonstraram que a M2-1 se liga preferencialmente às regiões *gene end* (GE) de sentido positivo e às sequências *poly-A* porém ainda não se conhece o mecanismo pelo qual a M2-1 melhora a eficiência de transcrição (BAILLY et al., 2016).

1.6.2 A nucleoproteína N

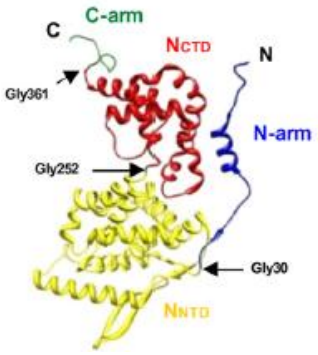
A proteína N possui 391 aminoácidos e sua estrutura foi resolvida através de expressão em bactéria, tendo sido caracterizada como arranjo em anel decamérico associado com o RNA bacteriano, assumindo-se que este anel possivelmente imita uma volta da hélice do RNP helicoidal (TAWAR et al., 2009). Os domínios N-terminal e C-terminal da N estão conectados através de uma região dobradiça, onde está associada uma sequência de 7 nucleotídeos de RNA. O arranjo dos nucleotídeos em relação à proteína N sugere que a passagem da polimerase pelo complexo N-RNA induz uma mudança conformacional temporária, que permite acesso ao RNA pela polimerase (COLLINS; MELERO, 2011).

A nucleoproteína N, como é característico para todos os vírus da ordem *Mononegavirales*, fica em contato com o RNA viral, o protegendo de RNases e prevenindo a formação de fitas duplas de RNA (GALLOUX et al., 2015; BOHMWALD et al., 2016). A associação da proteína N com o RNA constitui o nucleocapsídeo (NC), cuja estrutura foi caracterizada por microscopia eletrônica de alta resolução em organismo eucarioto, posteriormente à resolução por cristalografia (TAWAR et al., 2009). Nesse trabalho foi descrita uma estrutura em hélice flexível com número variável de proteínas N por volta, que serve como molde para a síntese de RNA realizada pela RNA polimerase RNA dependente (BAKKER et al., 2013).

A proteína N é subdividida em 4 principais domínios, o braço do N-terminal (*N-arm*), o domínio N-terminal (N_{NTD}), a região flexível que fica em contato com o RNA, o domínio C-Terminal (N_{CTD}) e o braço do C-terminal (*C-arm*) (Figura 6).

Experimentos com mutantes demonstraram que a interação entre N e P aparentemente ocorre através do C-terminal da N, em ligação com o C-terminal da P (GALLOUX et al., 2012), sendo que é reconhecido que o C-terminal da proteína N, durante a síntese de RNA, fica exposto de forma a permitir a interação desta região com a proteína P (COLLINS; MELERO, 2011).

Figura 6. Representação em 3D da proteína N do hRSV.



Representação e 3D da proteína N do HRSV. O braço do N-Terminal está em azul, o braço do C-terminal em verde, domínio N-terminal em amarelo e o domínio C-terminal em vermelho. As glicinas 30, 252 e 361, localizadas nas junções entre os domínios, estão indicadas. Fonte: GALLOUX et al., 2012.

1.6.3 A fosfoproteína P

A proteína P é composta de 241 aminoácidos, é estável na conformação tetramérica e seu domínio de oligomerização está localizado entre os resíduos 104 e 163 (Figura 7) (GALLOUX et al., 2012).

As interações proteína-proteína de P são de extrema importância, já que esta proteína é reconhecida com um co-fator do complexo RNP e a sua interação com L é essencial, considerando que P pode interagir com N e permitir que a polimerase (L) tenha acesso ao RNA (SHAPIRO et al., 2014; COLLINS, MELERO, 2011; BOHMWALD et al., 2016).

Dentre as diversas funções de P, é reconhecida também a sua importância nos eventos de alongamento dos transcritos e na adição do cap 5’por L (COLLINS e MELERO, 2011).

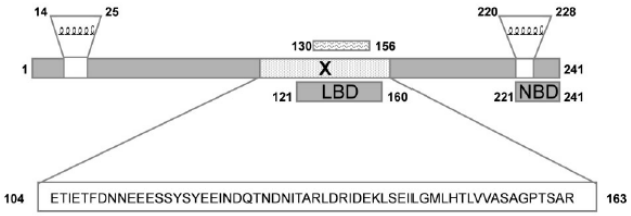
A proteína P também atua como uma chaperona, prevenindo a interação da N recém-sintetizada com o RNA celular durante o processo de formação de novas partículas virais nas

células infectadas (CANEDO-MARROQUIN et al., 2017).

A região C-terminal da proteína P (resíduos 161 até 241) está envolvida na interação com o nucleocapsídeo através de N (GALLOUX et al., 2012) e alguns experimentos com a proteína P do HRSV bovino (bRSV) sugerem que nessa proteína, de forma análoga, a região dos aminoácidos 161 a 180 também podem participar nas interações N-P (GALLOUX et al., 2015).

A fosforilação da proteína P tem um importante papel na infecção viral já que a ausência de cinco sítios de fosforilação nesta proteína reduziu a replicação viral *in vivo* em camundongos e *cotton rats*, e também em células HEp-2 *in vitro* (BOHMWALD et al., 2016).

Figura 7. Representação da estrutura primária da proteína P.



Representação da estrutura primária da proteína P. Indicação da localização da sequência de aminoácidos denominada fragmento X (resíduos 104 até a163) resistente à tripsina, do domínio de ligação à L (LBD), e do domínio de ligação à N (NBD). Duas α-hélices são previstas, dentro do N-terminal (resíduos 14 até 25) e do C-terminal (resíduos 220 até 228),sendo agrupamentos hidrofóbicos que caracterizam *coiled coils* (indicados). Fonte: LLORENTE et al., 2008.

1.6.4 Proteínas YBX1 e YBX3

As proteínas Y-box, do inglês *Y-box proteins* (YBP's), são uma superfamília de proteínas reguladoras de genes que atuam como ativadoras ou repressoras da transcrição no núcleo, e como ativadoras ou repressoras da tradução no citoplasma (MASTRANGELO; KLEENE, 2000).

Essa superfamília é representada por proteínas que possuem um domínio *cold shock* (CSD) (Figura 8) altamente conservado, que possui 43% de semelhança desde *E. coli* até humanos (DAVIES et al., 2000). O CSD é reconhecido por conter um estrutura de ligação ao DNA e RNA, também altamente conservada (MATSUMOTO; WOLFEE, 1998).

O domínio C-terminal das proteínas *Y-box* é representado por regiões compostas de

aminoácidos ácidos ou básicos, alternadamente, tendo cada uma destas regiões, cerca de 30 aminoácidos, que conferem a esse domínio a capacidade de se ligar aos ácidos nucléicos de forma mais fraca. Esse tipo de sequência (ácida ou básica) é uma característica comum de proteínas que se ligam aos complexos ribonucleoprotéicos e que se movimentam entre o núcleo e o citoplasma. Apesar de não ser possível identificar sequências de localização nuclear específicas nas proteínas *Y-box* de vertebrados, elas são encontradas em compartimentos celulares e nucleares (MATSUMOTO; WOLFEE, 1998).

Figura 8. Diagrama da estrutura molecular do CSD de YBX1 de *Bacillus subtilis*.

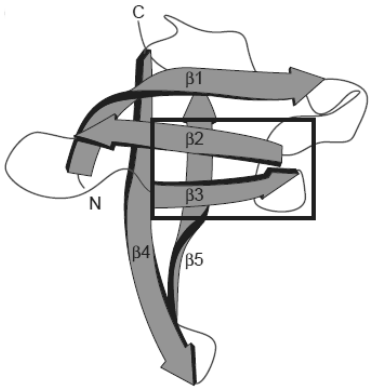


Diagrama da estrutura molecular do CSD de *Bacillus subtilis*. As folhas beta estão numeradas em ordem a partir do N terminal. O retângulo preto indica a superfície de ligação ao DNA. Fonte: MATSUMOTO; WOLFEE, 1998.

As proteínas *Y-box* foram caracterizadas pela sua capacidade de associação com promotores com a sequência *Y-box* (CTGATTGGCCAA), encontrada nos genes de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MATSUMOTO, WOLFEE 1998; LYABIN et al., 2014).

O papel fisiológico das proteínas *Y-box*, na ativação da transcrição, ainda não está definido porém evidências de experimentos *in vitro* demonstraram que a especificidade de ação dessas proteínas aparentemente está relacionada com associação na região dos promotores, já que as proteínas *Y-box* foram capazes de se ligar ao promotor de Hsp70 de Xenopus, ao promotor de timidina quinase do vírus da herpes e também foram capazes de ativar a expressão de gene repórter controlado por esses promotores, em experimentos de transfecção em células somáticas (MATSUMOTO; WOLFEE, 1998).

Duas das proteínas representantes desta família, que identificamos neste estudo, são as *Y-box binding protein 1* (YBX-1, YB-1, *Nuclease-sensitive element-binding protein 1*) e a *Y-box bindin gprotein 3* (YBX-3, CSDA, DBPA, ortólogo em camundongo MSY4) (LASHAM

et al., 2013; LU et al., 2006).

A proteína YBX1, a mais estudada de sua família, participa de uma grande variedade de eventos dependentes de RNA e DNA, incluindo a reparação de DNA, a transcrição e o *splicing* de pré-mRNA, o empacotamento de RNA e a regulação da estabilidade e tradução do mRNA (ELISEEVA et al., 2011).

A YBX1 é uma proteína composta por 323 aminoácidos e que possui, como características principais, a habilidade de interagir com ácidos nucléicos e também de formar homomultímeros e complexos com outras proteínas. Esta proteína possui três domínios, sendo a região N-terminal um domínio rico em alaninas e prolinas (domínio A/P), o domínio *cold shock* que interage com ácidos nucléicos e o grande domínio C-terminal (CTD) com agrupamentos alternados de resíduos carregados positivamente e negativamente onde ocorre a maioria das interações com outras proteínas (LYABIN et al., 2014). É reconhecido que o C-terminal também interage com DNA e RNA de fita simples, independentemente do domínio CSD (IZUMI et al., 2001).

Alguns experimentos demonstraram que a YBX1 está envolvida com a regulação da transcrição, já que um aumento de YBX1 na célula ou a translocação do citoplasma para o núcleo, foram acompanhadas do aumento ou diminuição da quantidade de mRNA's, expressão de proteínas codificadas por muitos genes responsáveis pela divisão celular, diferenciação e resistência a drogas. É comum associar a ação da YBX1 como sendo de um fator de transcrição, porém isto não pode ser considerado totalmente comprovado por que quando presente no núcleo, a YBX1 pode influenciar a quantidade de mRNA não somente pela transcrição, mas também através do processamento do pré-mRNA e da estabilidade do mRNA (LYABIN et al., 2014).

A influência da YBX1 sobre a transcrição não é dada somente através da interação com o *Y-box motif*, mas também através da interação com os *motifs* de DNA, e por influência da YBX1 para a estabilização ou desestabilização da dupla fita de DNA. Diversos experimentos demonstraram que normalmente a YBX1 não atua somente como um fator de transcrição tradicional, mas sim como um co-ativador ou co-repressor dos fatores de transcrição (LYABIN et al., 2014).

As proteínas YBX1 e YBX3 humanas possuem similaridade em 55% de seus aminoácidos na região N-terminal de ambas, sendo que a maior parte dos estudos sugere que a proteína YBX3 está envolvida na regulação da tradução via sequências de reconhecimento no RNA-alvo (SNYDER et al., 2015).

Em camundongos, a proteína YBX3 é amplamente expressa em embriões e testículos

em desenvolvimento e em testículos adultos. A expressão estendida de YBX3 durante a espermatogênese em camundongos transgênicos inibiu a tradução de vários mRNA's como os Prm1 (Protamina 1) e Prm2 (Protamina 2), resultando em esterilidade masculina dominante (SNYDER et al., 2015).

1.6.5 As poly-A binding proteins

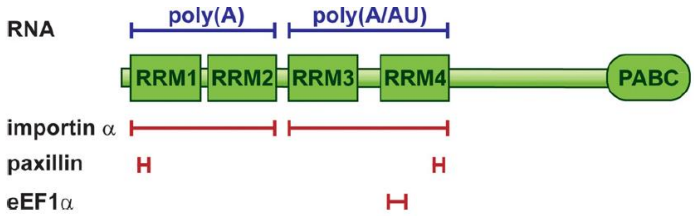
A família das *poly(A)-bindingproteins* (PABP's) apresenta uma distribuição predominantemente citoplasmática difusa mas essas proteínas também podem estar concentradas em locais onde ocorre a tradução (SMITH et al., 2014). As PABP's se ligam com alta especificidade à cauda poli-A e ficam complexadas ao mRNA citoplasmático, sendo essas proteínas então reconhecidas por mediarem as funções da cauda poli-A e por acompanharem os mRNA's desde a sua síntese no núcleo até a sua eventual destruição (BERNSTEIN, ROSS, 1989; ELISEEVA et al., 2013; GRAY et al., 2015).

A distribuição celular das PABP's pode mudar drasticamente em resposta ao *stress* celular ou à infecção viral, se tornando principalmente nuclear e/ou presente em focos citoplasmáticos, sendo que é reconhecido que as PABPC1 e PABP4 são transportadas entre o núcleo e o citoplasma (GRAY et al., 2015). A PABPC1 é amplamente expressa, enquanto a *poly(A)-binding protein 3* (PABP3) tem a sua expressão testículo-específica (SMITH, GRAY, 2010; GRAY et al., 2015).

Além da interação com o mRNA devido à sua grande afinidade com a cauda poli-A, é reconhecido que as PABP's interagem com muitas proteínas, envolvendo-as em eventos celulares (ELISEEVA et al., 2013). A região N-terminal da PABP é composta de quatro domínios não idênticos de reconhecimento de RNA (RRM's), que diferem quanto à especificidade de ligação às proteínas e ao RNA. A região C-terminal não se liga ao RNA, possui uma região rica em prolinas e constitui um domínio globular (PABC) (Figura 9) (SMITH, GRAY, 2010; DERRY et al., 2006).

A PABPC1 possui 636 aminoácidos e suas funções mais caracterizadas são a intensificação da tradução através da interação com fatores de iniciação da tradução que se ligam à extremidade 5' dos mRNA's, proteção da cauda poli-A contra a deadenilação e atuação no *turnover* de mRNA's (SMITH et al., 2014; SMITH,GRAY, 2010).

Figura 9. Os domínios das PABP's.



Os domínios das PABP's. Na figura estão representados os domínios compartilhados entre a PABPC1 e PABP4. Ambas possuem quatro regiões RRM's não idênticas, separadas do domínio globular por uma região *linker*. As linhas azuis indicam as regiões com capacidade de ligação ao RNA e as linhas vermelhas indicam as regiões de interação com outras proteínas. Fonte: GRAY et al., 2015.

A PABPC1 é considerada uma reguladora central do destino dos mRNA's citoplasmáticos, controlando as taxas de tradução e decaimento de mRNA's, tal como controlando a estabilidade e tradução específica (GRAY et al., 2015).

Experimentos com vertebrados não-mamíferos demonstraram que a PABPC4 aumenta a eficiência de tradução, evidenciada pela sua associação com os polissomos e a perda de polissomos após *knockdown*. Em experimentos com mamíferos a PABPC4 também foi relacionada com a estabilidade do mRNA, evidenciada pelo efeito de seu *knockdown* sobre mRNA's endógenos (SMITH et al., 2014).

Neste trabalho fizemos experimentos com a PABPC1 e adotamos a nomenclatura de Domínio 1 (D1), correspondente ao RRM1; Domínios 2 e 3 (D2-3), correspondentes aos RRM2 e 3 juntos e Domínio MELLE, correspondente ao Domínio globular PABC (resíduos 544 até 626).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do projeto é expressar as proteínas virais do complexo de replicação N, P e M2-1, realizar ensaios para identificar proteínas celulares interagentes com M2-1 individualmente ou com o conjunto dessas proteínas virais, e caracterizar essas interações.

2.2 Objetivos específicos

– Sub-clonar o gene de M2-1, otimizado para expressão em células humanas, no vetor pcDNA-FLAG e testar sua eficiência de expressão.

– Transfectar a linhagem celular HEK293T com vetores que expressam M2-1 isoladamente ou em conjunto com N e P, e submeter os produtos das imunoprecipitações com anti-FLAG à analise por espectrometria de massas.

– Dentre as proteínas identificadas, selecionar as de interesse e realizar ensaios para confirmar as interações, utilizando as técnicas de *Split-Nanoluc* e co-expressão de proteínas *in bacteria.*

- Verificar se há co-localização entre as proteínas celulares e virais em células transfectadas com vetores que as expressam, nas estruturas semelhantes a corpúsculos de inclusão formadas por N e P, através de microscopia de imunofluorescência.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

As técnicas de biologia molecular utilizadas neste trabalho foram baseadas em protocolos descritos em SAMBROOK et al., (1989), AUSUBEL et al., (1994) ou BOLLAG et al., (1996).

3.1 Cepas de Escherichia coli

As cepas de *Escherichia coli* utilizadas neste trabalho estão abaixo mencionadas.

- DH5α: *sup*E44 Δ*alc*U169 *(80lacZϕM15) hsd*R17 *rec*A1 *end*A1 *gyr*a96 *thi-1 rel*A1 (SAMBROOK et al., 1989).

- BL21 (DE3) pLysS: células que permitem a expressão de proteínas, com alta eficiência de qualquer gene sob o controle do promotor T7. A bactéria BL21(DE3) é lisogênica para λ-DE3, que contém o gene bacteriófago T7 I, e que codifica RNA polimerase T7 sob o controle do promotor *lac* UV5. Também contém um plasmídeo, pLysS, que transporta o gene que codifica para a lisozima de T7. Genótipo: F- ompT gal dcm lon hsdSB (rB- mB-) λ(DE3) pLysS (cmR) (STUDIER; MOFFATT, 1986).

- DH10B: A cepa MC1061 serviu como ponto de partida para que Hanahan e seus colaboradores, através de uma série de transduções P1, realocassem alelos que resultassem na DH10B. DH10B - F-*ara*D139 Δ(*araA-leu)*7697 Δ*(lac)*X74 *gal*E15 *gal*K16 *gal*U *hsd*R2 *rel*A1 *rps*L150(strR) *spo*T1 *deo*R ϕ80d*lacZ*ΔM15*end*A1 *nup*G *rec*A1 e14- *mcr*A Δ(*mrrhsd*RMS *mcr*BC) tonA (DURFEE et al., 2008).

- Stellar: as células *E.coli* HST08 *Premium Competent Cells* (Stellar - ClonTech®) não possuem os genes *mrr*, *hsdRMS*, *mcrBC* e *mcrA*, necessários para a quebra de DNA exógeno metilado. De acordo com essas propriedades, essas células são úteis para diversos usos, tais como clonagem de DNA metilado, construção de biblioteca genética e subclonagem de rotina. *E.coli* HST08 *Premium*- F⁻, *end*A1 , *supE44* , *thi*-1, *rec*A1, *rel*A 1, *gyr*A96, *pho*A , ϕ80d*lacZ*ΔM15, Δ(*lacZYA – argF) U169* , Δ (*mrr - hsdRMS - mcrBC*), Δ*mcrA* ,λ– (TANAKA, 2018).

3.2 Otimização de códons e plasmídeos utilizados

Os vírus com genoma de RNA que possuem a sua própria RNA polimerase RNA dependente, responsável pela síntese de seus mRNA’s no citoplasma da célula hospedeira, tendem a ter genes que não estão adaptados para a expressão no núcleo celular. Sendo assim,

os problemas que ocorrem durante a expressão de genes virais pela Pol II, como os do hRSV, podem ser superados pela troca dos códons do genes virais pelos códons mais utilizados pelas células hospedeiras (TERNETTE et al., 2007).

Dentre as alterações da otimização é possível citar o uso dos códons adaptados aos da célula, a remoção de sinais de *splicing* e poliadenilação prematuros, a adaptação do conteúdo GC ao conteúdo do genoma celular, a eliminação de sequências repetitivas e a modificação da estrutura secundária do RNA para minimizar o pareamento intramolecular (SIMABUCO, 2008).

Em vários plasmídeos utilizados neste trabalho foram subclonados genes com a otimização de códons para expressão em células humanas, tendo em conta que este processo de otimização consiste em modificar a sequência de nucleotídeos dos genes, sem alterar a sequência de aminoácidos codificados.

A descrição dos plasmídeos que utilizamos neste trabalho, será feita nos itens em que detalhamos construções de novos vetores, ou em procedimentos que utilizamos vetores adquiridos ou obtidos em trabalhos anteriores.

3.3 Linhagens celulares

As células HEK293T são originadas de rim de embrião humano e expressam o antígeno T do vírus SV 40. Essas células crescem em monocamadas, não apresentam as junções *tight* e não expressam as claudinas 1, 3 e 4, o que faz com que estas células sejam altamente transfectáveis (GRAHAM, 1973; LIN et al., 2014).

As células humanas HEp-2 foram originalmente isoladas de carcinoma epitelial de laringe contaminada com HeLa, o que gerou a linhagem atual (SCHERER, 1953). A infecção e o efeito citopático do hRSV são muito bem caracterizados nessas células.

3.4 O vírus hRSV (cepa A2)

O hRSV é encontrado dentro de 2 subgrupos (hRSV-A e hRSV-B), sendo que atualmente os dois subgrupos são classificados com base na variabilidade da sequência da segunda região hiper-variável do gene G (MALASAO et al., 2015). Os vírus do subgrupo A foram encontrados mais frequentemente na maioria dos períodos epidêmicos (CANE, 2007). É reconhecido que a cepa A2 (um protótipo do vírus do grupo A, originalmente isolado na Austrália em 1961), tem um mRNA de G de 918 nucleotídeos (SULLENDER, 2000).O vírus

utilizado neste trabalho foi um protótipo do subgrupo A, a cepa A2, gentilmente cedido pela Dra. Marilda Siqueira Departamento de Virologia da FIOCRUZ-RJ.

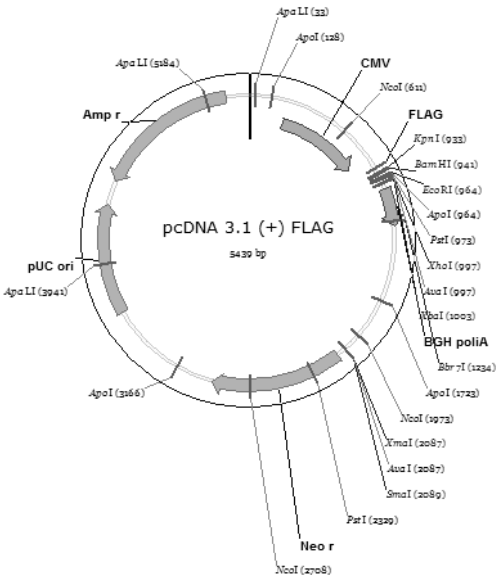
3.5 Construção do vetores pFLAG-M2-1, pShuttle-M2-1 e pM2-1-FLAG-CT

À Figura 10 está apresentado o vetor pcDNA3-FLAG utilizado para a clonagem do gene M2-1, gerando pCDNA3-FLAG-M2-1 (Figura 11). Os procedimentos realizados nesta construção estão descritos nos próximos itens.

Para a construção do vetor pShuttle-M2-1, foi feita a sub-clonagem do M2-1 nos sítios XbaI e AflII do *multiple cloning site* do vetor pShuttle, de forma similar aos procedimentos descritos em SIMABUCO (2009), que realizou a construção de pShuttle-N e pShuttle-P anteriormenre no laboratório.

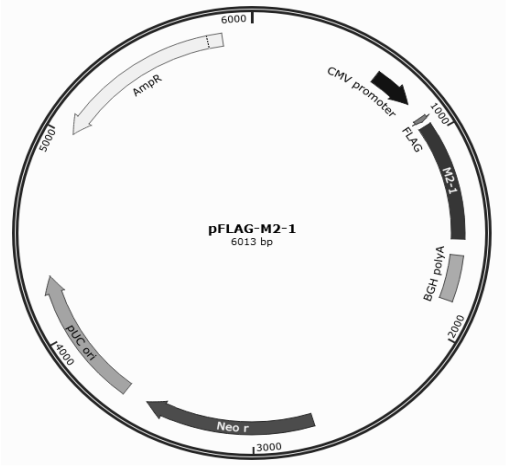
O vetor pcDNA3.1-M2-1-FLAG-CT foi encomendado à *GeneArt*, a partir da sequência de aminoácidos da proteína M2-1 (hRSV cepa A2, GI: 3089381), tal como descrito para a construção de pFLAG-M2-1.

Figura 10. Mapa do vetor pcDNA3-FLAG.



Foi utilizado o programa Vector NTI 10.3.0 para acessar a representação do mapa do vetor pcDNA3-FLAG. Estão apresentados os principais elementos do vetor. Imagem não publicada.

Figura 11. Representação da Construção pcDNA3-FLAG-M2-1.



Foi utilizado o programa SnapGene 4.1.6 para criar a representação do mapa do vetor pcDNA3-FLAG-M2-1. Imagem não publicada.

A partir da sequência de aminoácidos da proteína M2-1 (hRSV cepa A2, GI: 3089381), foi solicitada a síntese do gene M2-1 à *GeneArt*. Este foi entregue flanqueado pelos sítios BamHI e EcoRI, em vetor pMAT, com otimização de códons para expressão em células humanas.

Aproximadamente 3 µg do vetor pcDNA3-FLAG foram digeridas com BamHI e EcoRI. O vetor pMAT –M2-1 foi digerido com as mesmas enzimas, sob as mesmas condições, liberando o fragmento correspondente à sequência de M2-1.

A digestão das amostras foi verificada por gel de agarose (Invitrogen) 1%, e a banda correspondente ao vetor pcDNA3-FLAG linearizado e a sequência de M2-1 foram purificadas através do *Quick gel Extraction & PCR purification Combo kit* (Invitrogen). A reação de ligação foi feita utilizando *T4 DNA ligase* (NEB) em temperatura ambiente. As bactérias DH10B eletrocompetentes foram transformadas por eletroporação com a reação de ligação e submetidas à moderada agitação em LB por 2 horas. Foi feito o posterior plaqueamento em LB-agar com ampicilina e a incubação da placa foi feita por 16 horas a 37°C.

As colônias foram colocadas para crescer em meio LB líquido por 16 horas a 37°C com ampicilina e a cultura celular foi sujeita à extração de DNA por lise alcalina.

3.6 Análise dos clones

A confirmação da presença do gene M2-1 nas colônias obtidas foi feita através de PCR de colônia, procedimento que utiliza as colônias que foram previamente transformadas com a reação de ligação e crescidas em meio seletivo. Essas colônias foram coletadas e colocadas em um *mix* de PCR contendo os oligonucleotídos (apresentados abaixo) para a realização de amplificação de uma porção do gene M2-1, com o intuito de verificar se o gene de interesse estava presente (BERGKESSEL; GUTHRIE, 2013).

Nucleotídeos utilizados:

Sense 5' TGCCACTTCAGCCAGAACTA3'

Antisense 5' ATGCTGCCGATGTAGCTTTC3'

Após a análise dos produtos de PCR em gel de agarose e identificação das colônias positivas para a presença de M2-1(dados não apresentados), as colônias positivas correspondentes foram inoculadas em meio LB líquido com ampicilina e submetidas à preparação para extração do DNA plasmidial por lise alcalina.

O vetor construído pCDNA3-FLAG-M2-1 (representado na Figura 11) foi sujeito à digestão com BamHI e EcoRI (Figura 21). Esse plasmídeo foi sequenciado utilizando os mesmos oligonucleotídeos citados acima, através do serviço de sequenciamento de DNA pelo método de Sanger, feito pelo Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-tronco (Instituto de Biociências - USP).

3.7 Western Blotting

Células HEK293T foram cultivadas em placas de 24 poços (cerca de $5x10^4$ células por poço) e transfectadas com os plasmídeos pcDNA-FLAG-M2-1 ou pcDNA-FLAG (cerca de 0,5 µg por poço). A transfecção foi realizada com os reagentes Lipofectamina e Plus (Invitrogen) e após 48 horas as células foram coletadas com o tampão de amostra 1x (tampão de amostra 4X: Tris-HCl 240 mM, pH 6.8; glicerol 40%; dodecil sulfato de sódio 8%; azul de bromofenol 0,04%; β-mercaptoetanol 5%).

Os lisados celulares foram submetidos a SDS-PAGE e após a separação, as proteínas foram transferidas para as membranas de nitrocelulose 0,45µm (*Amersham*™*Protran*®) através do método semi-seco de transferência. Posteriormente, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio (5% de leite desnatado em PBS 1x com *Tween 20* 0,1 %) por 16 horas a 4ºC.

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários (anti-

M2-1, da Abcam ou anti-FLAG, da Sigma) diluídos em solução de bloqueio (PBS 1X; 0.1% *Tween 20*; 5% leite) por 1 h a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas 3 vezes com a solução de lavagem (PBS 1X; 0,1 % *Tween 20*) em temperatura ambiente por 15 minutos, e posteriormente incubadas com os anticorpos secundários conjugados à peroxidase (Sigma) por 1 h em temperatura ambiente (*anti-rabbit* na membrana incubada com o anti-FLAG e *anti-mouse* na membrana incubada com o anti-M2-1).

Foram feitas mais 3 lavagens com a solução de lavagem. Essas membranas foram então tratadas com *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce) por 5 minutos e expostas a filme de raios-X, Hyperfilm (*Amersham Biosciences*), por 15 minutos e estes foram revelados em câmara escura (Figura 22).

3.8 Ensaio de imunofluorescência (FLAG-M2-1/ N/ P)

Foi realizado o ensaio de imunofluorescência para identificar a expressão das proteínas FLAG-M2-1, N e P. Células HEK293T foram cultivadas em placas de 96 (10^4 células por poço), e as transfecções (0,1 ug de plasmídeo por poço) foram realizadas com Lipofectamina e reagente Plus (Invitrogen) conforme as instruções dos fabricantes. As células foram lavadas com PBS 1X e foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos a 4°C.

Após a fixação as células foram incubadas com solução de permeabilização (PBS 1X; 0.5% de Triton X100) por 30 minutos a 37°C e a solução foi desprezada em seguida. Posteriormente foi adicionada a solução de bloqueio (PBS 1X; 0.1% de Triton X100. 0,1% de BSA) e as células foram mantidas a 37°C por 45 minutos, sendo bloqueio desprezado. As células foram então incubadas na solução PBS-*Tween*-BSA (PBS 1X; 0.1% de *Tween 20*; 0.5% de BSA) com os anticorpos primários monoclonais anti-M2-1 (Abcam), anti-FLAG (Sigma-Aldrich), anti-N (Abcam) e anti-P (Abcam), diluídos (1:200) em solução de bloqueio, com incubação de 16 horas a 4°C sob moderada agitação.

As células foram então lavadas 3 vezes com a solução de lavagem (PBS 1X; 0.2% Triton X100) e então incubadas em na solução de PBS-*Tween*-BSA com os anticorpos secundários conjugados *anti-rabbit* Alexa fluor 488 (verde),*anti-mouse* Alexa flúor 594 (vermelho)(Abcam) e DAPI (1:500), diluídos 1:200 em solução de bloqueio,com incubação de 1 hora a 37°C. Posteriormente as células foram lavadas com a solução de lavagem 3 vezes e então foram analisadas no microscópio de fluorescência Zeiss.

3.9 As imunoprecipitações com FLAG-beads

Os ensaios de imunoprecipitação foram realizados em células HEK293T, em garrafas de 75 cm^2 (10^6 células por garrafa) transfectadas com os plamídeos de interesse (6µg por garrafa), indicados nas legendas das tabelas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 e o controle negativo transfectado com o plasmídeo pcDNA-FLAG-vazio. As transfecções foram realizadas com a Lipofectamina 2000 e após 48 horas as células foram lavadas com PBS 1X e adicionado o tampão de lise celular (*Cell Signaling Technology*)contendo inibidor de protease (Sigma-Aldrich)e inibidor de fosfatase (Sigma-Aldrich).

Os lisados foram centrifugados a 5.000 rpm a 4°C por 10 minutos e aos sobrenadantes foram adicionados *Anti-FLAG M2 Agarose Beads* (Sigma-Aldrich), e estas foram mantidas sob agitação moderada a 4°C por uma hora.

As *Beads* foram precipitadas por centrifugação, lavadas com TBS pH 7.6, ressuspendidas em TBS pH 7.6 contendo o peptídeo FLAG na concentração de 150 ng/µl e incubadas a 4°C por 30 minutos sob agitação moderada. Foi coletado o sobrenadante com as proteínas de interesse e armazenado a -20°C e foram feitas posteriores digestões em solução e análise por espectrometria de massas (conforme o item 3.10).

3.10 Digestão em Solução e análise por espectrometria de massas

Para realizar a análise por espectrometria de massas, as amostras de proteínas foram quantificadas com o *Qubit Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific*) e submetidas à digestão em solução com tripsina.

Para o procedimento de dessalinização, foram utilizadas colunas com a membrana C18 (Thermo) e posteriormente as amostras foram secas com o *Speed Vac* por 1 hora e meia e armazenadas a -20º C até o envio para análise por espectrometria de massas.

A amostra da imunoprecipitação de FLAG-M2-1 (Tabela 1) foi sujeita à análise por espectrometria de massas com o LTQ-Orbitrap Velos ETD (Thermo) acoplado com o *EasynanoLC II* (Thermo) no Centro de Facilidades de Apoio a Pesquisa (CEFAP, ICB-USP).

Uma alíquota da mesma amostra de FLAG-M2-1 acima, foi também sujeita à análise por espectrometria de massas na Central Analítica – IQ USP (Tabela 2) com o maxis 3G (BrukerDaltonics), analisador ESI-QUAD-TOF (*Electrospray Ionization – Time-of-flight*) maxis.

As amostras das imunoprecipitações de M2-1-FLAG-CT, FLAG-N, FLAG-P e do complexo FLAG-N/M2-1/P foram analisadas pela Central Analítica (IQ-USP) sob as mesmas

condições citadas anteriormente.

A análise por espectrometria de massas fornece uma lista de proteínas que foram identificadas das amostras. Para a composição dos nossos resultados, foram comparadas as proteínas presentes nas células lisadas, após a transfecção, em relação às proteínas presentes na amostra controle (células transfectadas com FLAG-vazio). Somente as proteínas que não estavam presentes na amostra controle foram selecionadas para compor as tabelas com os resultados.

O *Score*, apresentado nas tabelas, foi um critério de seleção para a escolha das quatro primeiras proteínas identificadas do *pull down* com FLAG-M2-1. O *score* representa um valor calculado que demonstra a chance do *match* (comparação entre os peptídeos identificados e a base de dados utilizada para comparação) não ser um falso positivo. Valor de *score* acima de 70 representa um *match* significante ($p < 0.05$).

Os resultados estão apresentados nas tabelas 3, 4, 5 e 6, respectivamente.

3.11 Análise de complementação de luciferase dividida (Split-NanoLuc) para a interação entre M2-1 e YBX3

O S*plit-NanoLuc* consiste em um tipo de ensaio de complementação onde fragmentos complementares de uma luciferase repórter estão em fusão com um par de proteínas cuja interação se deseja testar. É reconhecido que os fragmentos da enzima repórter exibem baixa atividade separadamente, porém a sua atividade de luminescência é recuperada quando esses fragmentos são aproximados através da interação de seus parceiros fundidos (DIXON et al., 2015).

A *NanoLuc*, proteína repórter utilizada nesse experimento, é uma pequena luciferase de 19 kDa. É originária de um camarão de águas profundas, o *Oplophorus gracilirostris*, e sua atividade é identificada através do uso do substrato furimazine (BOUTE et al., 2016). Foi modificada geneticamente sendo os fragmentos de *NanoLuc* otimizados para os ensaios de *split* denominados 11S (corresponde aos primeiros 156 aminoácidos,com massa de 18 kDa) e 114 (corresponde aos últimos 13 aminoácidos, com massa de 1.3 kDa) (DIXON et al., 2015).

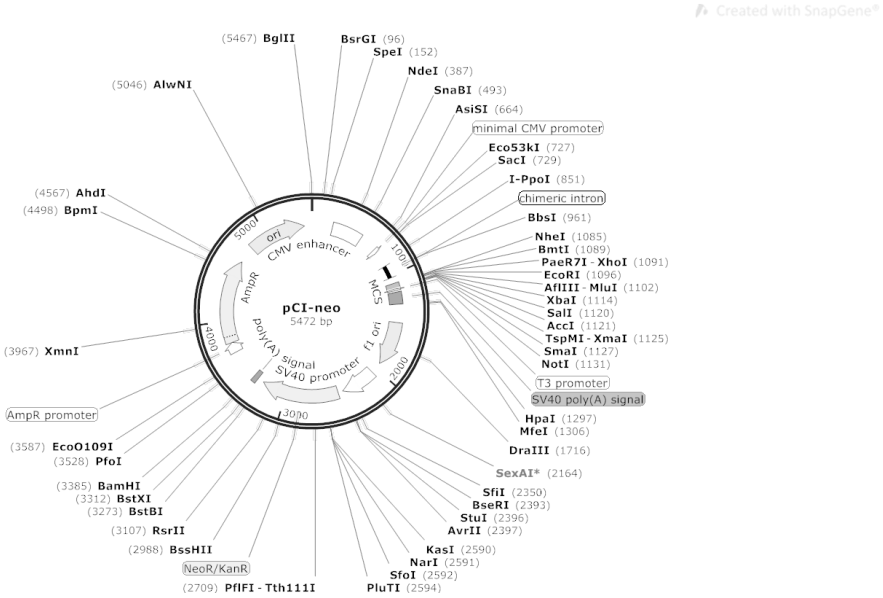
A partir da identificação da proteína celular YBX3 na amostra de imunoprecipitação de FLAG-M2-1 (Tabela 1 e Tabela 2), foi planejada a construção dos vetores pCIneo- M2-1-114CT e pCIneo-YBX3-11SCT.O vetor pCIneo-M2-1-114CT foi construído no laboratório nosso colaborador Dr. Jean-François Eléouët, pela Dra. Monika Bajorek. Isso foi feito através

da amplificação de M2-1 por PCR e clonagem no vetor pCIneo-114CT. A construção do vetor pCIneo-YBX3-11SCT está descrita a seguir.

3.12 Construção do vetor pCI-neo-YBX3-11S-CT

Aproximadamente 3 µg do vetor pCI-neo-11S-CT (Figura 12) foram linearizados com as enzimas MluI e SalI. O vetor pUC57-YBX3 foi digerido com as mesmas enzimas que o vetor pCI-neo-11S-CT, sob as mesmas condições, liberando o fragmento correspondente à sequência de YBX3. A digestão das amostras foi verificada por gel de agarose 1%, e a banda correspondente ao vetor pCI-neo-11S-CT linearizado e a banda de YBX3 foram purificadas através do *PCR clean-up Gel extraction kit* (Macherey-Nagel) (dado não apresentado).

Figura 12. Mapa do vetor pCI-neo.



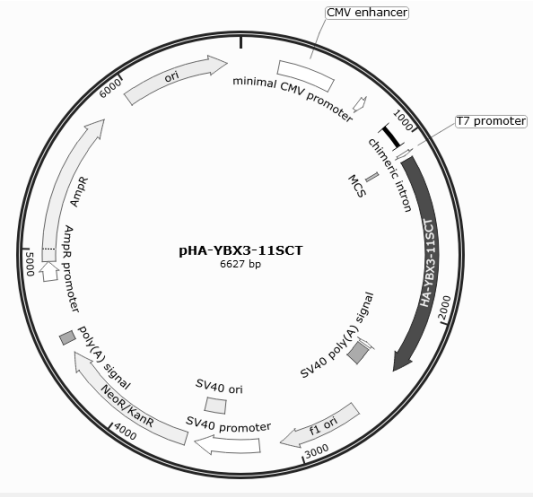
Foi utilizado o programa SnapGene 4.1.6 para acessar a representação do mapa do vetor pCI-neo no site da Promega (*Ac number* U47120). Imagem não publicada.

A reação de ligação entre vetor e inserto foi feita com a ligase do *Rapid DNA Ligation Kit* (*Thermo Scientific*) por 30 minutos em temperatura ambiente. As bactérias Stellar quimiocompetentes (Clontech) foram misturadas com a reação de ligação e mantidas a 4°C por 1 hora e submetidas a 42°C por 1 minuto. Foi feito a seguir o plaqueamento das bactérias transformadas em LB-agar com ampicilina, com incubação da placa *overnight* à 37°C.

As colônias foram colocadas para crescer em LB líquido com ampicilina por 16 horas à 37°C, e a cultura celular foi sujeita à extração de DNA com o *Plasmid DNA Purification NucleoSpin* (Macherey-Nagel) e o DNA obtido foi sujeito à digestão com MluI e SalI (Figura 26 em Resultados). A amostra de DNA foi submetida ao serviço de sequenciamento.

À Figura 13 está representada a construção que foi feita.

Figura 13. Representação da construção do vetor pCI-neo-HA-YBX3-11S-CT.



Foi utilizado o programa SnapGene 4.1.6 para fazer a representação da construção pCI-neo-HA-YBX3-11S-CT. Imagem não publicada.

3.13 Ensaio de Split-NanoLuc

Células HEp-2 foram plaqueadas em placa de 48 poços (cerca de $5x10^4$ células por poço) e foram feitas transfecções com a Lipofectamine 2000 (Invitrogen), com os plasmídeos de interesse (0,5 µg de DNA) citados nas figuras dos resultados.

As células foram lavadas com PBS e lisadas com o *Nano-Glo Luciferase Assay Buffer* (Promega) e mantidas sob agitação moderada por 1 hora em temperatura ambiente. As amostras foram então transferidas para uma placa branca de 96 poços e foi adicionado o N*ano-Glo Luciferase Assay Substrate* (Promega) em cada poço e foi feita a leitura de luminescência da placa com o *Infinite 200 Pro (Tecan).*

3.14 Ensaios com a YFP (Yellow Fluorescent Protein) para caracterização da interação entre M2-1 e YBX3.

O ensaio de fluorescência com a *split-YFP* (*Yellow Fluorescent Protein*) é um método de estudo para as interações proteína-proteína, que se baseia no princípio de que os dois fragmentos da proteína YFP (o N terminal, denominado como YFP1 e C terminal,

denominado como YFP2) não apresentam fluorescência quando expressos de forma separada porém, quando os fragmentos da YFP estão em fusão com duas proteínas distintas que possuem capacidade de interação entre elas, as porções da YFP ficam então aproximadas, de modo que pode ocorrer a dobragem correta das porções da YFP e o sinal de fluorescência pode ser gerado (THOMAS 2008, HORSTMAN et al., 2014).

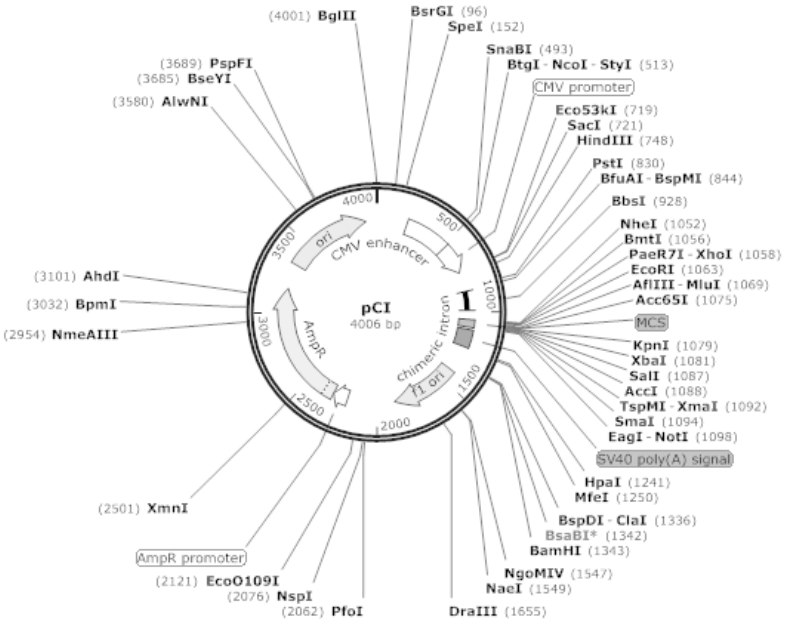
3.15 Construção dos vetores pM2-1-YFP2 e pHA-YBX3-YFP1

Para a construção dos vetores pCI-HA-YBX3-YFP1 e pCI-YFP2-M2-1, aproximadamente 5 µg de cada um dos vetores (pCI-YFP1 e pCI-YFP2, à figura 14 está apresentado o vetor p-CI) utilizado para as construções foram linearizados com EcoRI e SalI. Os vetores pCI-neo-HA-YBX3-11S-CT (que contém o inserto de interesse HA-YBX3) e pCI-neo-M2-1-11S-CT (que contém o inserto de interesse M2-1) também foram digeridos com EcoRI e SalI, sob as mesmas condições, liberando os fragmentos correspondentes às sequências de HA-YBX3 e M2-1, respectivamente. As digestões das amostras foram verificadas por gel de agarose 1%, e as bandas correspondentes aos vetores e insertos foram purificadas através do *PCR clean-up Gel extraction kit* (Macherey-Nagel), (dados não apresentados).

As reações de ligação foram feitas com os vetores e seus respectivos insertos, utilizando a ligase do *Rapid DNA Ligation Kit* (Thermo Scientific). As bactérias Stellar quimiocompetentes (Clontech) foram transformadas com as reações de ligação e foi feito o posterior plaqueamento das bactérias em LB-agar com ampicilina, com a incubação das placas mantidas *overnight* à 37°C.

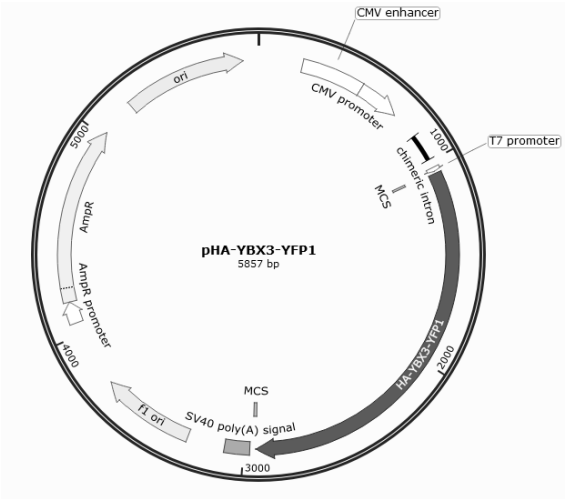
As colônias foram colocadas para crescer em LB líquido por 16 horas à 37°C com ampicilina, e as cultura celulares foram sujeitas à extração de DNA com o *Plasmid DNA Purification NucleoSpin* (Macherey-Nagel) e os DNA's obtidos foram sujeitos à digestão com EcoRI e SalI (na Figura 29 em Resultados está apresentada a digestão de pYFP2-M2-1). As Amostras selecionadas de DNA's foram submetidas ao serviço de sequenciamento. Na Figura 15 está apresentada a representação da construção pCI-HA-YBX3-YFP1 e na figura 16 está apresentada a representação da construção pCI-YFP2-M2-1.

Figura 14. Mapa do vetor pCI.



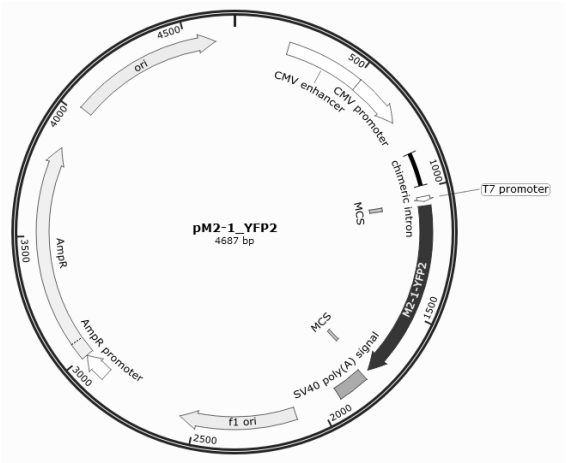
Foi utilizado o programa SnapGene 4.1.6 para acessar a representação do mapa do vetor pCI através do site da Promega. Imagem não publicada.

Figura 15. Representação da construção do vetor pCI-HA-YBX3-YFP1.



Foi utilizado o programa SnapGene 4.1.6 para fazer a representação da construção pCI-HA-YBX3-YFP1. Imagem não publicada.

Figura 16. Representação da construção do vetor pCI-M2-1-YFP2.



Foi utilizado o programa SnapGene 4.1.6 para fazer a representação da construção pCI-M2-1-YFP2. Imagem não publicada.

3.16 Ensaios de imunofluorescências (HA-YBX3-YFP1 e M2-1-YFP2 em HEp-2 e HA-YBX3 e M2-1 em BEAS-2B)

Como será comentado adiante em Resultados, a partir das transfecções feitas em HEp-2, não foi possível identificar nenhum sinal da fluorescência de YFP (dados não apresentados). Optou-se então por fazer o ensaio de imunofluorescência indireta com anticorpos primários para a identificação de HA-YBX3 e de M2-1.

As células HEp-2 foram cultivadas em placa de 24 poços sobre lamínulas de vidro e foram transfectadas com as combinações de plasmídeos descritas às legendas Figuras 30, 31 e 32 de Resultados.

As transfecções foram realizadas com Lipofectamina 2000 (Invitrogen) conforme as instruções do fabricante. As células foram fixadas com a solução de parafolmaldeído (4% paraformaldeído em PBS 1X), o bloqueio foi feito em solução de bloqueio PBS-Triton-BSA (PBS 1X, 0,2% de Triton X-100, 3% de BSA), sendo esta a mesma solução utilizada para a diluição dos anticorpos monoclonais anti-HA (1:1000), anti-N (1:2000) e anti-M2-1 (1:500) (Sigma-Aldrich),por uma hora e meia sob moderada agitação em temperatura ambiente.

A solução de lavagem foi feita com PBS e Triton X-100 (PBS 1X; 0.2% Triton X-100). Os anticorpos secundários *anti-rabbit* (Alexa fluor 568) e *anti-mouse* (Alexa fluor 488), ambos da Thermo Fisher, também foram diluídos em solução de bloqueio (1:1000, para ambos anticorpos). As montagens das lâminas foram feitas com *NucBlue Live Ready Probes* (Thermo Fisher) e estas lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência.

Foi feito também um ensaio de imunofluorescência em células BEAS-2B, linhagem

celular de epitélio brônquico humano, considerado um modelo para estudos toxicológicos (GARCIA-CANTON et al., 2013), para a detecção de HA-YBX3 e M2-1, com vetores que não continham os domínios da YFP (experimento realizado pela Dra. Bajorek, no INRA) (Figura 33).

3.17 Detecção de interação entre PABP, YBX3 e M2-1 in bacteria

Uma maneira de estudar interações entre proteínas, é a estratégia que foi utilizada anteriormente para caracterizar interações entre proteínas do hRSV pelo grupo do Dr. Éleouet (GALLOUX et al., 2012). Para tanto, bactérias *E.coli* BL21 são co-transformadas com os vetores pGEX e pET, cada um contendo o gene de uma das proteínas que se quer testar a interação. Como os vetores pGEX e pET têm marcas de seleção diferentes, as bactérias co-transformadas são semeadas em placas com os dois antibióticos.

A partir da identificação da proteína celular PABPC1 e YBX3 na amostra de imunoprecipitação de FLAG-M2-1 (Tabela 1 em Resultados), foram construídos os vetores pGEX-GST-D1, pGEX-GST-D2-3 e pGEX-GST-MELLE e foram realizados experimentos de expressão desses domínios da PABP em fusão com a GST (*Glutathione S-transferase)* e também a sua co-expressão com pET-28-M2-1 (construído pelo grupo do Dr. Jean-François Eléouët, BLONDOT et al., 2012). Também foi construído o vetor pGEX-YBX3, conforme descrito no itens a seguir.

A técnica de expressão de proteínas recombinantes em *E.*coli se inicia com a clonagem do gene de interesse em um vetor de expressão e a posterior transformação de *E.coli* com esse vetor para gerar a expressão da proteína recombinante, que será posteriormente purificada (CECCARELLI; ROSANO, 2014).

A *tag GST* é uma proteína que tem alta afinidade por glutationa, o que garante uma alta eficiência no processo de purificação, ao se utilizar diretamente o lisado bacteriano e fazer *pull down* com *Glutathione Sepharose Beads (GS Beads)* (GE HealthCare) (CHATERJEE; ESPOSITO, 2006).

3.18 Construção dos vetores para a expressão de proteínas recombinantes in bacteria

À figura 17 está apresentado o vetor pGEX-4T-3 utilizado para as sub-clonagens que deram origem a: pGEX-GST-D1,pGEX-GST-D2-3 e pGEX-GST-MELLE (Figuras 18, 19 e 20, respectivamente) e a pGEX-HA-GST-YBX3.Aproximadamente 7 µg do vetor pGEX-4T-3 foram linearizados com SmaI e BamHI .

Para fazer a amplificação dos domínios de PABPC1, foi realizada reação de PCR com a *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (NEB), utilizando pCDNA-PABP e os oligonucleotídeos descritos o próximo parágrafo. As condições da PCR foram: I) 95°C por 2 minutos, II) 95°C por 30 Segundos, III) 55°C por 30 segundos, IV) 72°C por 1 minuto, V) 72° C por 10 minutos, sendo os passos II, III e IV repetidos 30 vezes. A amplificação dos domínios foi verificada por gel de agarose 1% (dados não apresentados).

A seguir estão apresentados os oligonucleotídeos utilizados.

D1:

Sense 5' GAGGAGGGATCCATGGCCTCGCTCTACGTGGGGGACCTCC 3'

Antisense 5' TTAGCCTACTCCACTTTTGCGAAGTGATGG 3'

D2-3:

Sense 5' GAGGAGGGATCCGGAGTAGGCAACATATTCATTAAAAATC 3'

Antisense 5' TTATTTCTGAGCTCGACCAACATAAATTTG 3'

MELLE:

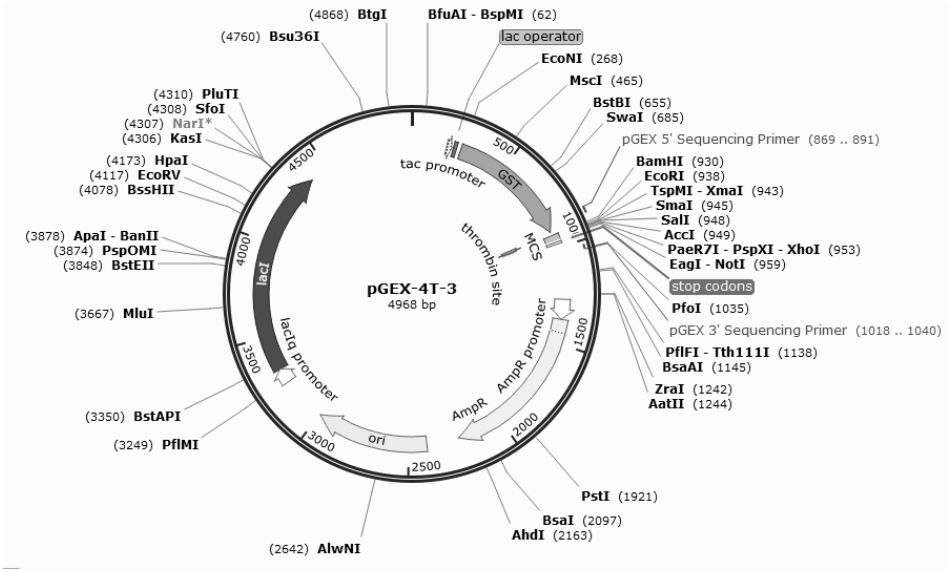
Sense 5' GAGGAGGGATCCCCTTTGACTGCTTCCATGTTGGCATCTGC 3'

Antisense 5' TTAAACAGTTGGAACACCGGTGGCAC 3'

Os amplificados foram digeridos comas mesmas enzimas que o vetor pGEX-4T-3, sob as mesmas condições, e então a amostra foi verificada por gel de agarose 1% e a bandas correspondentes ao vetor pGEX-4T-3 linearizado e aos amplificados de cada um dos domínios foram purificadas através do *PCR clean-up Gel extraction kit* (Macherey-Nagel). A reação de ligação entre vetor e inserto foi feita com a ligase do *Rapid DNA Ligation Kit* (Thermo Scientific), por 30 minutos em temperatura ambiente. As bactérias quimiocompetentes Stellar (Clontech) foram transformadas com a reação de ligação e posteriormente foi feito o plaqueamento dessas transformações em LB-agar com ampicilina, com incubação da placa *overnight* à 37°C.

As colônias foram colocadas para crescer em meio LB líquido por 16 horas à 37°C com ampicilina, e a cultura celular foi sujeita à extração de DNA com o *Plasmid DNA Purification NucleoSpin* (Macherey-Nagel). O DNA obtido foi sujeito à digestão com BamHI e XhoI e o plasmídeo obtido foi submetido ao serviço de sequenciamento.

Figura 17. Mapa do vetor pGEX-4T-3.

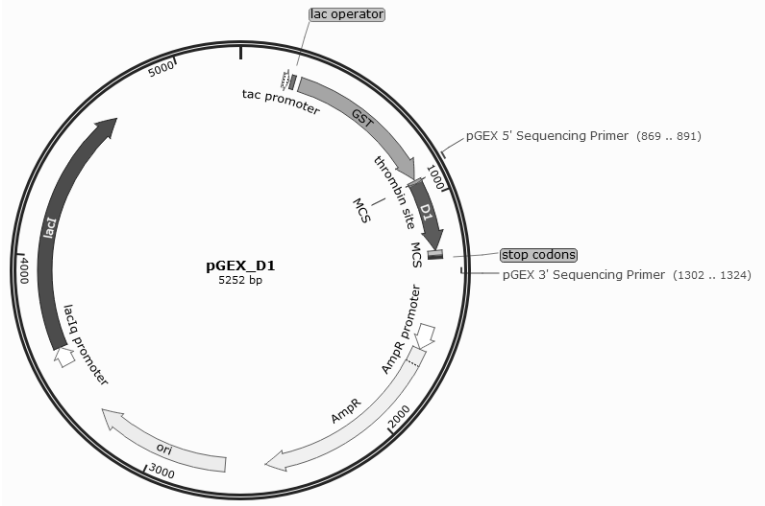


Foi utilizado o programa SnapGene 4.1.6 para acessar a representação do mapa do vetor pGEX-4T-3, no site da GE HealthCare. Imagem não publicada.

A seguir estão representados os vetores construídos.

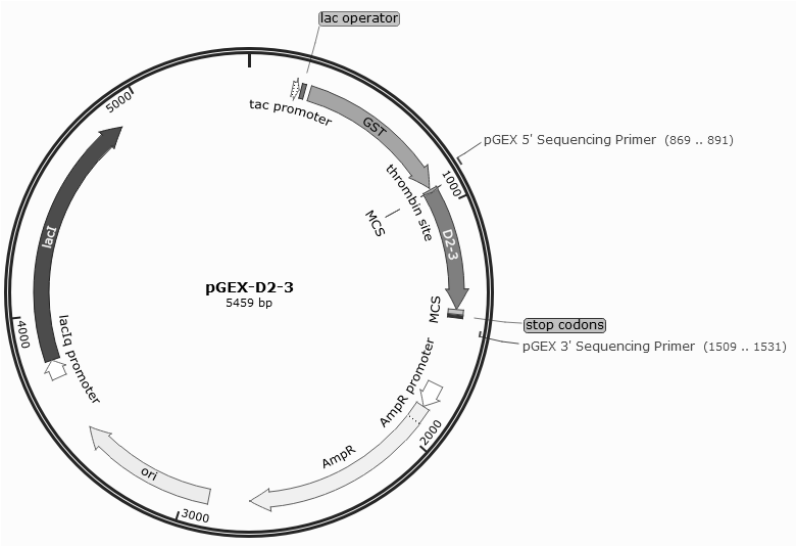
Representação esquemática do vetor pGEX-GST-D1.

Figura 18. Representação esquemática do vetor pGEX-GST-D1.



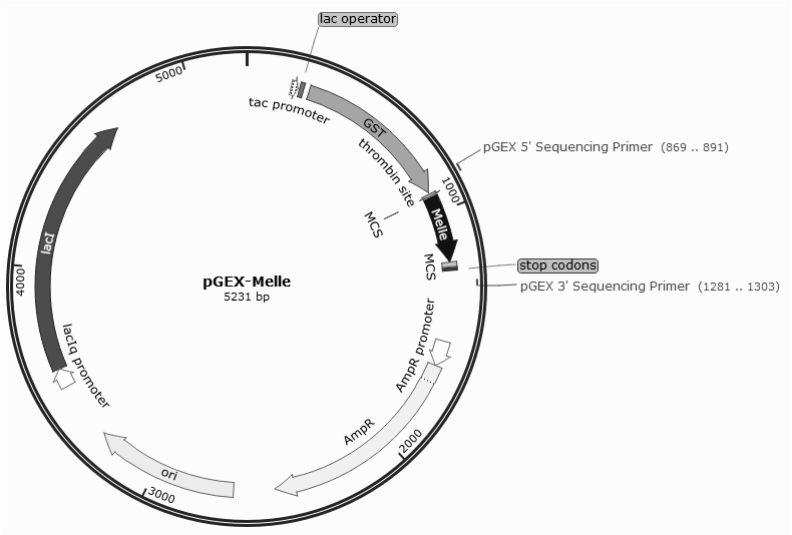
Foi utilizado o programa SnapGene 4.1.6 para construir a representação do mapa do vetor pGEX-D1. Imagem não publicada.

Figura 19. Representação esquemática do vetor pGEX-GST-D2-3.



Foi utilizado o programa SnapGene 4.1.6 para construir a representação do mapa do vetor pGEX-D2-3. Imagem não publicada.

Figura 20. Representação esquemática do vetor pGEX-GST-MELLE.



Foi utilizado o programa SnapGene 4.1.6 para construir a representação do mapa do vetor pGEX-MELLE. Imagem não publicada.

3.19 Construção do vetor pGEX-GST-HA-YBX3

O vetor pUC57-YBX3 (GenScript) foi digerido com as enzimas SmaI e BamHI e foi subclonado no vetor pGEX, seguindo os passos de sub-clonagem seguintes, conforme o item

3.18. O plasmídeo obtido, pGEX-HA-GST-YBX3, foi submetido ao serviço de sequenciamento.

3.20 Purificação e co-purificação de proteínas recombinantes expressas em E. coli

Com as construções feitas em pGEX, foram feitos experimentos de expressão individual, ou a co-expressão em conjunto com pET-28-M2-1 (construído pelo grupo do Dr. Jean-François Eleouet, BLONDOT et al., 2012), em bactérias BL21 quimiocompetentes. Foram feitas as transformações individuais com os plasmídeos, que estão citados nos títulos de cada imagem, nos resultados.

O procedimento de expressão consistiu na transformação de BL21 quimiocompetentes com 0,1 µg de cada plasmídeo, incubadas por 1 hora a 37°C em LB sem antibióticos foram posterioemente plaqueadas em LB-agar com o antibiótico correspondente (ampicilina para pGEX e kanamicina para pET) e mantidas por 16 horas a 37°C.

Uma colônia foi selecionada e colocada para crescer em 3 mL de LB com antibióticos por 16 horas a 37°C. Os 3 mL de pré-cultura foram adicionados à 250 mL de LB fresco com antibiótico, mantidos sob agitação à 37°C por aproximadamente 2 horas até que fosse atingida a OD de 0,6 e então foi adicionado o IPTG (concentração final de 0,33 mM) e a cultura foi mantida sob agitação por mais 3 horas a 25°C.

A cultura foi então centrifugada por 15 minutos a 5000 rpm e o precipitado foi ressuspendido no tampão de lise (Tris pH 7.8 50 mM, NaCl 60 mM, DTT 2 mM, EDTA 1mM, Triton X-100 0, 2%, 1 pílula de antiprotease Roche) e então foi adicionada lisozima (1 mg/mL). Os lisados foram mantidos sob agitação por 1 hora a 4°C.

Foi feita a sonicação a 30W em 3 ciclos de 15 segundos de aplicação e 15 segundos de pausa. O lisado foi então centrifugado a 1000 rpm por 30 minutos e o precipitado foi descartado. O lisado foi então incubado com as *GS Beads* e mantido e por 1 hora a 4°C sob agitação. As *GS beads* foram então lavadas 3 vezes com o tampão de lise (10 vezes o volume) e 3 vezes com PBS.

As *GS beads* foram posteriormente fervidas em *Laemmli buffer*, analisadas por SDS-PAGE e coradas por *Coomassie blue*.

Além do *pull down* das *GS beads* a partir dos extratos bacterianos, também foi testada a incubação das *GS beads*, obtidas ao final do processo de purificação,com a proteína M2-1 purificada seguida de *pull down*.

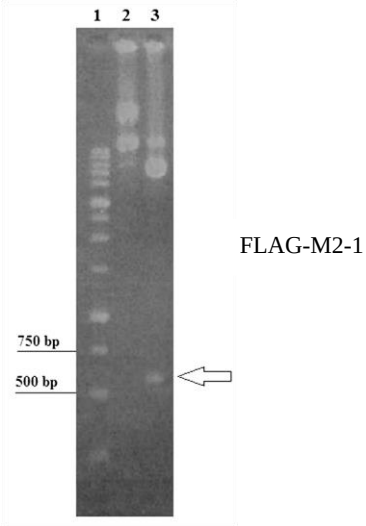
4 RESULTADOS

4.1 Construção do vetor FLAG-M2-1

O sistema FLAG, explorando a alta imunogenicidade desse peptídeo, é um dos mais utilizados para imunoprecipitação de proteínas e para identificar interações proteína-proteína (Terpe, 2003). O gene M2-1 foi subclonado no vetor pcDNA-FLAG, plasmídeo modificado a partir da subclonagem da sequencia de Flag no vetor pcDNA3 da Invitrogen conforme o procedimento descrito no item 3.5 de Materiais e métodos gerando o plasmídeo pcDNA-FLAG-M2-1 (representado à na Figura 11).

A confirmação da presença do gene M2-1 após a seleção de uma colônia e amplificação do plasmídeo foi feita digestão com as enzimas de restrição apropriadas (Figura 21). Foi feito também sequenciamento de DNA (método de Sanger) pelo Centro de Pesquisa Sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (IB-USP), para conferir a sequencia clonada.

Figura 21. Análise da digestão do plasmídeo pcDNA-FLAG-M2-1.



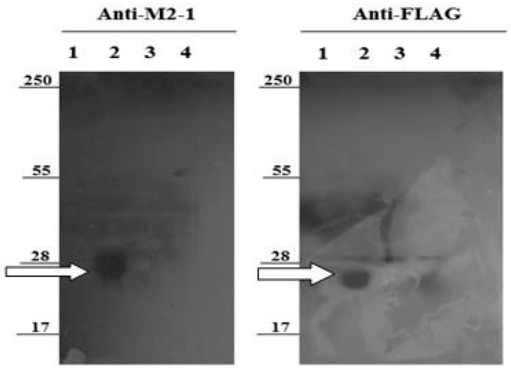
Análise do plasmídeo pcDNA-FLAG-M2-1. Está apresentada foto gel de agarose 1% corado com brometo de etídio após eletroforese. 1: Marcador (*1 kb DNA Ladder RTU Kasvi*). 2: pcDNA-FLAG-M2-1 não digerido. 3: pcDNA-FLAG-M2-1 digerido com EcoRI e BamHI. A seta branca indica fragmento de aproximadamente 600 bp correspondente ao gene FLAG-M2-1.

4.2 Expressão da proteína FLAG-M2-1

O vetor pcDNA3-FLAG-M2-1 foi transfectado em células HEK293T. A expressão da proteína de fusão FLAG-M2-1, próximo ao tamanho esperado, foi confirmada pelo ensaio de

Western Blotting (Figura 22) com os anticorpos anti-M2-1 (Abcam) e anti-FLAG (Sigma), conforme o procedimento descrito no item 3.7. Este ensaio demonstrou a eficiência desse vetor e também que a presença do peptídeo FLAG não interferiu na detecção por anti-M2-1.

Figura 22. Análise por Western blot da expressão da proteína FLAG-M2-1.



Análise por *Western blot* da expressão da proteína FLAG-M2-1 na linhagem celular HEK293T. O procedimento de transfecção e *Western Blotting* está descrito no item 3.7 de Materiais e métodos (marcador *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo*, tamanhos em kDa à esquerda). Está apresentado o autorradiograma e as setas indicam as bandas correspondentes à proteína FLAG-M2-1. Anticorpos primários utilizados anti-M2-1 (Abcam) e anti-FLAG (Sigma), como indicado. Amostras de extratos celulares das transfecções: 1- pFLAG; 2- pFLAG-M2-1; 3 – controle sem transfecção; 4 – controle com reagentes de transfecção.

4.3 Análise da expressão das proteínas M2-1, N e P por imunofluorescência

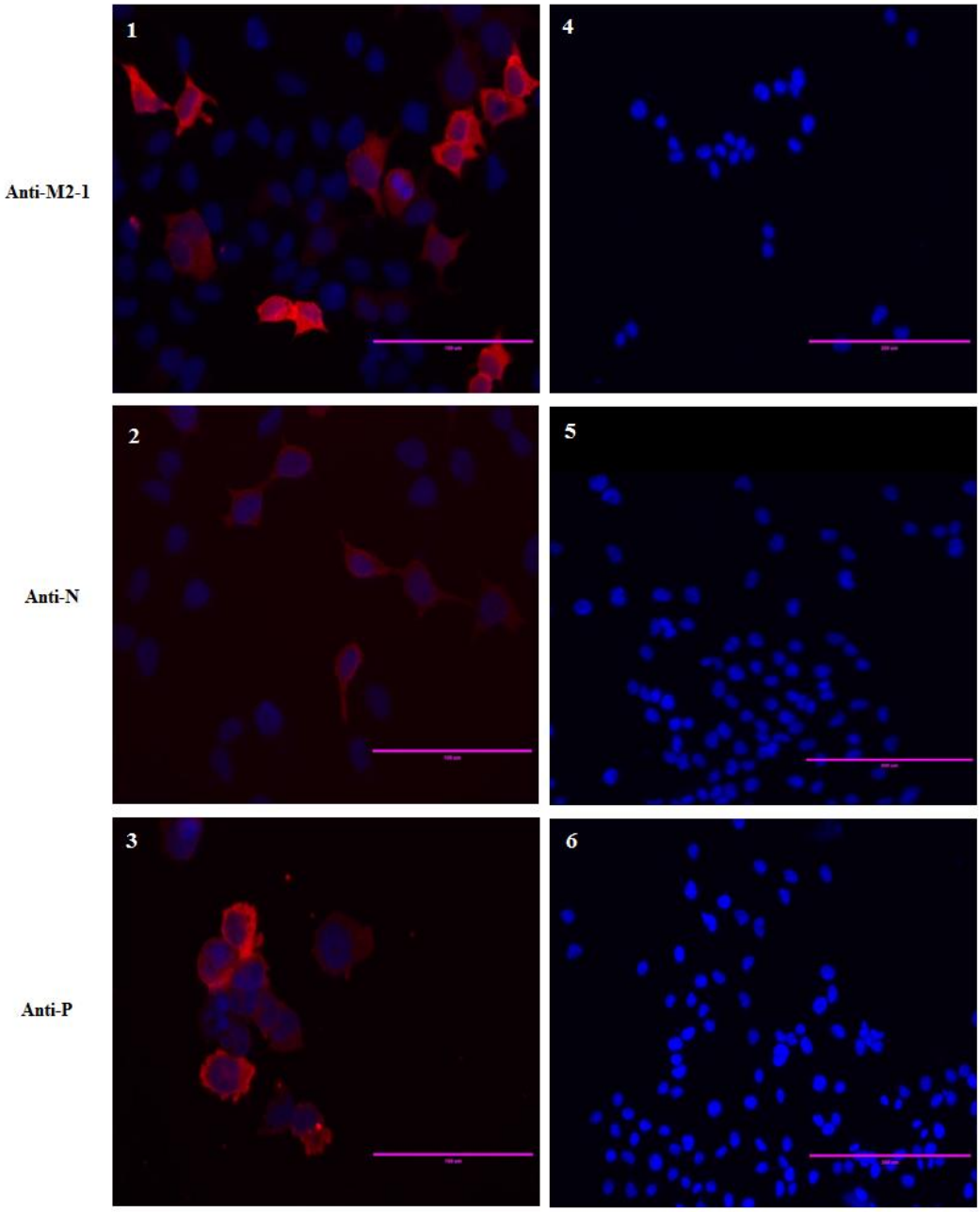
Além da função de reguladora da transcrição, é reconhecido que em células infectadas a proteína M2-1 possui uma função estrutural complementar sobre a qual foi demonstrado que a M2-1 co-localiza com as inclusões citoplasmáticas, associando-se ao RNP através de P e com o domínio N-terminal de M (TANG et al., 2001, KISS et al., 2014). Os experimentos apresentados a seguir visam verificar se a proteína de fusão FLAG-M2-1 localiza-se nas estruturas *IB like*, tal como ocorre com a M2-1 nos corpúsculos de inclusão na infecção viral.

Fizemos o ensaio de imunofluorescência para identificar a expressão das proteínas FLAG-M2-1, N e P em células HEK293T, como descrito no item 3.8 de Materiais e Métodos. Foi feita a transfecção apenas com um tipo de plasmídeo (pcDNA-FLAG-M2-1, ou pShuttle-N, ou Shuttle-P), ou dois tipos de co-transfecções, a primeira com o intuito de verificar os *IB's like*, sem a presença da M2-1 (pShuttle-N e pShuttle-P) ou a transfecção foi feita com o intuito de verificar os *IB's like*, na presença de M2-1 (foram transfectados pcDNA-FLAG-M2-1, Shuttle-N e pShuttle-P em conjunto).

À Figura 23 os vetores pcDNA-FLAG-M2-1, pShuttle-N ou pShuttle-P foram transfectados individualmente nas células. Podemos observar que as proteínas expressas adquirem um padrão de dispersão no citoplasma. À Figura 24 os vetores pShuttle-N e

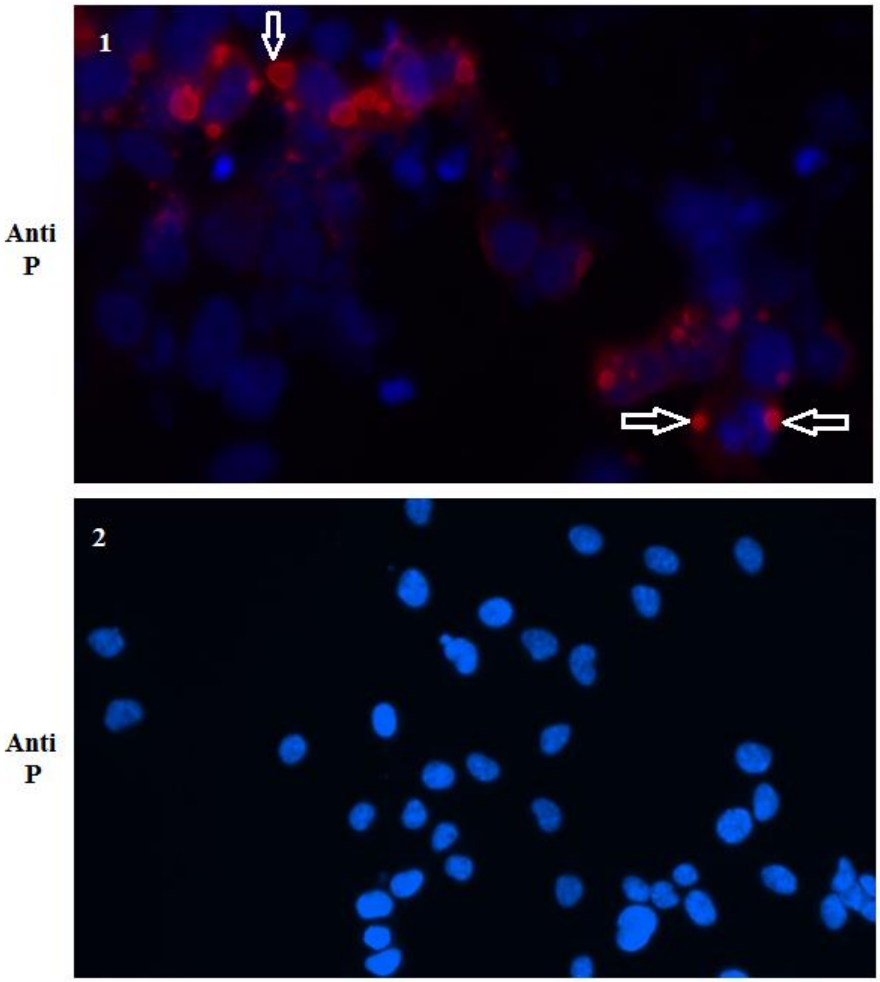
pShuttle-P foram co-transfectados nas células. Podemos observar que as proteínas expressas adquirem um padrão estruturado com forma arredondada, no citoplasma. Essas estruturas assemelham-se a estruturas presentes em células infectadas pelo hRSV, e as denominamos *IB's like*, ou semelhantes aos *inclusion bodies* (CARROMEU, 2007).

Figura 23. Imunofluorescência da expressão das proteínas FLAG-M2-1, N e P.



Análise por imunofluorescência da expressão das proteínas FLAG-M2-1, N e P em células HEK293T.1: transfecção com pcDNA-FLAG-M2-1 (40x). 2: transfecção com pShuttle-N (40x). 3: transfecção com pShuttle-P (40x). 4: células não-transfectadas e marcadas com anti-M2-1 (20x). 5: células não-transfectadas e marcadas com anti-N (20x). 6: células não transfectadas e marcadas com anti-P (20x). As proteínas foram identificadas com anticorpos primários específicos (Abcam) e com o anticorpo secundário Alexa Fluor-594 (Abcam). Os núcleos foram corados com DAPI. Ver item 3.8 de Materiais e métodos.

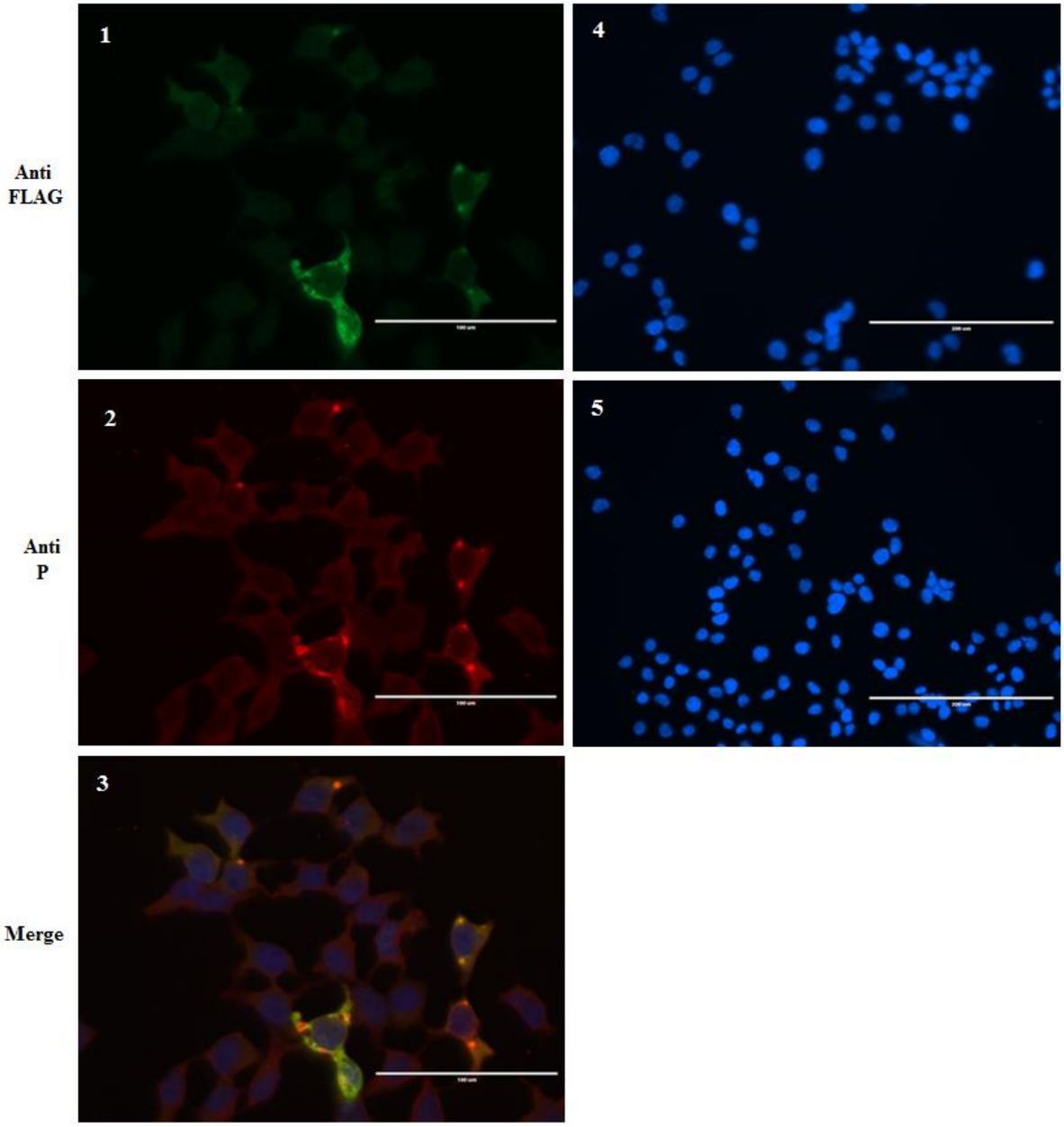
Figura 24. Imunofluorescência da co-expressão das proteínas N e P.



Análise por imunofluorescência da co-expressão das proteínas N e P em células HEK293T. 1: co-transfecção com pShuttle-N e pShuttle-P (60x). 2: células não-transfectadas e marcadas com anti-P (Abcam) e com o anticorpo secundário Alexa Fluor-594 (Abcam) (60x). Os núcleos foram corados com DAPI. Ver item 3.8 de Materiais e métodos.As setas brancas indicam as estruturas *IB like*.

À Figura 25 os vetores pcDNA-FLAG-M2-1, pShuttle-N e pShuttle-P foram co-transfectados nas células. Podemos observar que as proteínas expressas co-localizam nos *IB like*, portanto, indicando que a presença do peptídeo FLAG em M2-1 não interfere com um padrão similar à co-localização nos corpúsculos de inclusão observado para M2-1 no contexto de infecção viral.

Figura 25. Imunofluorescência da co-expressão das proteínas FLAG-M2-1, N e P.



Análise por imunofluorescência da co-expressão das proteínas FLAG-M2-1, N e P em células HEK293T. 1, 2 e 3: co-transfecção com pcDNA-FLAG-M2-1,pShuttle-N e pShuttle-P (40x).1: a proteína FLAG-M2-1 está marcada com o anti-FLAG, secundário Alexa flúor 488, anti-rabbit, em verde (Abcam). 2: a proteína P está marcada com o anti-P (Abcam), secundário Alexa Fluor-59 4, em vermelho (Abcam). 3: Imagens 1 e 2 sobrepostas. 4: células não-transfectadas e marcadas com anti-FLAG (20x). 5: células não-transfectadas e marcadas com anti-P (20x).Ver item 3.8 de Materiais e métodos.

4.4 Análises por espectrometria de massas (FLAG-M2-1)

Para identificação das proteínas celulares co-imunoprecipitadas com FLAG-M2-1, as amostras de proteínas obtidas por imunoprecipitação com FLAG-*Beads* foram processadas e enviadas para análise por espectrometria de massas, como descrito no item 3.10.

Esse experimento foi feito duas vezes e as amostras enviadas para o Centro de Facilidades de Apoio a Pesquisa (CEFAP-ICB-USP), resultados apresentados à Tabela 1, e para a Central Analítica (IQ-USP) resultados apresentados à Tabela 2. Selecionamos as proteínas presentes apenas nas co-imunoprecipitações com FLAG-M2-1 e com score mais alto.

Apesar dos equipamentos e as bases de dados utilizados serem diferentes, encontramos duas proteínas com maior grau de confiança presentes nas duas análises, a *poly(A)-binding protein cytoplasmic 1* (PABPC1) e a *Y-box binding protein 3* (YBX3). Consideramos relevante também o achado da *Nuclease-sensitive element-binding protein 1* (YBX1), apesar de esta ter sido identificada apenas na análise do CEFAP, porém com um *score* alto.

Tabela 1. Identificação por espectrometria de massas das proteínas celulares co-imunoprecipitadas com FLAG-M2-1 (análise feita pelo CEFAP).

Uniprot ID	Proteína	Organismo	Score	Número de sequências	Número de sequências significantes	Massa (Da)
A0A024R9E2	Poly(A) binding protein, citoplasmic 1	*Homo sapiens*	140,21	6	2	70400
A0A087X1S2	Nuclease sensitive element binding protein 1	*Homo sapiens*	129,75	5	4	34000
B1ANR0	Poly(A) binding protein, citoplasmic 4	*Homo sapiens*	125,89	5	1	67900
P16989-3	Isoform 3 of Y-box-binding protein 3	*Homo sapiens*	124,71	4	3	37000

Identificação por espectrometria de massas das proteínas celulares co-imunoprecipitadas com FLAG-M2-1. Na análise feita pelo CEFAP, conforme descrito no item 3.10, os dados coletados foram pesquisados contra a base de dado de proteínas humanas Uniprot, utilizando o programa Proteome Discovery 1.4 (ThermoScientific). O *Score* é a soma da pontuação iônica de todos os peptídeos que foram identificados.

Tabela 2. Identificação por espectrometria de massas das proteínas celulares co-imunoprecipitadas com FLAG-M2-1 (análise feita pela Central Analítica).

Uniprot ID	Proteína	Organismo	Score	Número de sequências	Número de sequências significantes	Massa
Q5R8F7	Polyadenylate-binding protein 1	*Pongo abelii*	63	10	5	70826
Q9JKB3	Y-box-binding protein 3	*Mus musculus*	43	5	1	38790

Identificação por espectrometria de massas das proteínas celulares co-imunoprecipitadas com FLAG-M2-1. Na análise feita pela Central Analítica do IQ-USP, conforme descrito no item 3.10, os dados coletados foram pesquisados contra a base de dados genérica de proteínas Uniprot(sem restrição para proteínas humanas) utilizando o programa Mascot (Matrix Science). A definição de *score* é a mesma da legenda da Tabela 1. Não foram fornecidos dados da cobertura.

4.5 Análises por espectrometria de massas (M2-1-FLAG-CT)

Para identificação das proteínas celulares co-imunoprecipitadas com M2-1-FLAG-CT, as amostras de proteínas obtidas por imunoprecipitação com FLAG-*Beads* (a partir de células transfectadas como descrito no item 3.9), foram processadas e enviadas para análise por espectrometria de massas, como descrito no item 3.10

A imunoprecipitação realizada com a construção M2-1-FLAG-CT (proteína M2-1 em fusão com o peptídeo FLAG no C-terminal, dados apresentados na Tabela 3) confirmou a presença das proteínas PABP1, PABP4, YBX1 e YBX3 em concordância com os dados encontrados anteriormente na análise pelo CEFAP (Tabela 1). Esse resultado também confirma a detecção de YBX1 e YBX3 na análise pela Central Analítica do IQ-USP (Tabela 2).

Tabela 3. Identificação por espectrometria de massas das proteínas celulares co-imunoprecipitadas com M2-1-FLAG-CT.

Uniprot ID	Proteína	Organismo	Score	Número de sequências	Número de sequências significantes	Massa (Da)
Q5R8F7	Polyadenylate-binding protein 1	*Pongo abelii*	5088	31	27	70826
Q9H361	Polyadenylate-binding protein 3	*Homo sapiens*	3311	19	14	70215
Q13310	Polyadenylate-binding protein 4	*Homo sapiens*	2249	28	22	71080
P62960	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	*Mus musculus*	1862	12	10	35709
P16989	Y-box-binding protein 3	*Homo sapiens*	1537	14	11	40066

Identificação por espectrometria de massas das proteínas celulares co-imunoprecipitadas com M2-1-FLAG-CT. Na análise feita pela Central Analítica, conforme descrito no item 3.10, os dados coletados foram pesquisados contra a base de dados genérica de proteínas Uniprot revisada (sem restrição para proteínas humanas) utilizando o programa Mascot (Matrix Science). A definição de *score* é a mesma da legenda da Tabela 1.

4.6 Análises por espectrometria de massas (FLAG-N)

Para identificação das proteínas celulares co-imunoprecipitadas com FLAG-N, as amostras de proteínas obtidas por imunoprecipitação com FLAG-*beads* (a partir de células transfectadas como descrito no item 3.9) foram processadas e enviadas para análise por espectrometria de massas, como descrito no item 3.10, com os resultados apresentados na Tabela 4.

A interação da proteína N com a Hsp70 foi anteriormente identificada no contexto de análise por espectrometria de massas após imunoprecipitação e digestão em gel, com alto *score* na identificação da proteína Hsp70 (OLIVEIRA et al., 2013).

Tabela 4. Identificação por espectrometria de massas das proteínas celulares co-imunoprecipitadas com FLAG-N.

Uniprot ID	Proteína	Organismo	Score	Número de sequências	Número de sequências significantes	Massa (Da)
P0DMV8	Heat shock 70 kDa protein 1A	*Homo sapiens*	81	11	1	70294

Identificação por espectrometria de massas das proteínas celulares co-imunoprecipitadas com FLAG-N. Na análise feita pela Central Analítica, conforme descrito no item 3.2.1.11, os dados coletados foram pesquisados contra a base de dados genérica de proteínas Uniprot (sem restrição para proteínas humanas) utilizando o programa Mascot (Matrix Science). A definição de *score* é a mesma da legenda da Tabela 1.

4.7 Análises por espectrometria de massas (FLAG-P)

Para identificação das proteínas celulares co-imunoprecipitadas com FLAG-P, as amostras de proteínas obtidas por imunoprecipitação com FLAG-*Beads* (a partir de células transfectadas como descrito no item 3.9), foram processadas e enviadas para análise por espectrometria de massas, como descrito no item 3.10, com os resultados apresentados na Tabela 5. A interação da proteína P com a Hsp70 também foi identificada em trabalho anterior do laboratório (OLIVEIRA et al., 2013).

Tabela 5. Identificação por espectrometria de massas das proteínas celulares co-imunoprecipitadas com FLAG-P.

Uniprot ID	Proteína	Organismo	Score	Número de sequências	Número de sequências significantes	Massa (Da)
P0DMV8	Heat shock 70 kDa protein 1A	*Homo sapiens*	2817	23	16	70294
P17066	Heat shock 70 kDa protein 6	*Homo sapiens*	1232	11	8	71440

Identificação por espectrometria de massas das proteínas celulares co-imunoprecipitadas com FLAG-P. Na análise feita pela Central Analítica, conforme descrito no item 3.10, os dados coletados foram pesquisados contra a base de dados genérica de proteínas Uniprot (sem restrição para proteínas humanas) utilizando o programa Mascot (Matrix Science). A definição de *score* é a mesma da legenda da Tabela 1.

4.8 Análises por espectrometria de massas (FLAG-N, P e M2-1)

Foram feitos experimentos preliminares de co-expressão e co-imunoprecipitação com diferentes combinações contendo uma das três proteínas com o FLAG no amino terminal (FLAG-M2-1/N/P, FLAG-N/M2-1/P, ou FLAG-P/M2-1/N). Para cada experimento foram feitos *western blots*, para verificar qual proteína com FLAG era mais eficiente em co-imunoprecipitar as outras duas, concluindo-se que a combinação FLAG-N/M2-1/P foi mais eficiente (dados não apresentados). A análise por espectrometria de massas das proteínas co-imunoprecipitadas com FLAG-N/P/M2-1 foi efetuada após análise preliminar por *western blot*, confirmando a detecção das três proteínas virais (dado não apresentado).

Para identificação das proteínas celulares co-imunoprecipitadas com FLAG-N, P e M2-1 (co-transfecção dos três vetores que as expressam), as amostras de proteínas obtidas por imunoprecipitação com FLAG-*Beads* (a partir de células transfectadas com os plasmídeos descritos no item 3.9) foram processadas e enviadas para análise por espectrometria de massas, como descrito no item 3.10, com os resultados apresentados na Tabela 6.

Ao comparar as proteínas celulares co-imunoprecipitadadas com FLAG-N, P e M2-1 expressas em conjunto, em relação às proteínas que foram co-imunoprecipitadas nos quatro outros experimentos de co-imunoprecipitação das proteínas expressas individualmente (Tabelas 2, 3, 4 e 5), foi possível identificar outras proteínas celulares além das detectadas anteriormente. A identificação de HSP90, nucleofosmina e da sub-unidade pICIn do metilossomo, indica que essas proteínas virais formam uma estrutura capaz de recrutar proteínas celulares adicionais.

Tabela 6. Identificação por espectrometria de massas das proteínas celulares co-imunoprecipitadas com FLAG-N, P e M2-1.

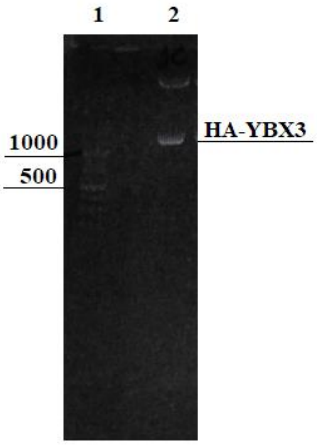
Uniprot ID	Proteína	Organismo	Score	Número de sequências	Número de sequências significantes	Massa (Da)
P0DMV8	Heat shock 70 kDa protein 1A	*Homo sapiens*	2522	25	17	70294
Q4R4T5	Heat shock protein HSP 90	*Macaca fascicularis*	1127	21	15	83527
Q5R8F7	Polyadenylate-binding protein 1	*Pongo abelii*	542	12	6	70826
Q3T160	Nucleophosmin	*Bos taurus*	406	5	4	32854
Q28618	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	*Oryctolagus cuniculus*	293	7	2	35803
Q04753	Methylosome subunit pICln	*Rattus norvegicus*	58	1	1	26190
P16989	Y-box-binding protein 3	*Homo sapiens*	55	5	2	40066

Identificação por espectrometria de massas das proteínas celulares co-imunoprecipitadas com FLAG-N, P e M2-1. Na análise feita pela Central Analítica, conforme descrito no item 3.10, os dados coletados foram pesquisados contra a base de dados genérica de proteínas Uniprot (sem restrição para proteínas humanas) utilizando o programa Mascot (Matrix Science). A definição de *score* é a mesma da legenda da Tabela 1.

4.9 Construção dos vetores e ensaios de Split-NanoLuc

A identificação da proteína celular YBX3 nas amostras de imunoprecipitação de FLAG-M2-1, FLAG-M2-1-CT e FLAG-N/M2-1/P (Tabelas 1, 2, 3 e 6) indica que tem um papel importante na funcionalidade dos *IB's*. Assim resolvemos analisar a interação YBX3-M2-1 com mais detalhe. Foram construídos os vetores pCIneo-M2-1-114-CT (construído no laboratório do Dr. Eléouët) e pCIneo-YBX3-11SCT (construção descrita no item 3.12) com o intuito de realizar o ensaio de *Split-NanoLuc*. A representação deste plasmídeo está apresentada na Figura 13 em Materiais e métodos, e a confirmação da presença da sequencia codificante de HA-YBX3 à Figura 26.

Figura 26. Digestão da construção pHA-YBX3-11S-CT.



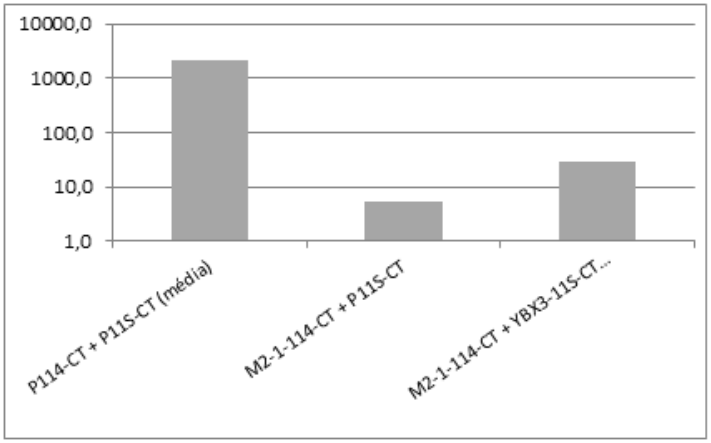
As amostras foram corridas em gel de agarose 1% corado com *SYBR® Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen). 1: Marcador (*100 bp DNA Ladder GBR*). 2: pCI-neo-HA-YBX3-11S-CT digerido com MluI e SalI.

Com esses dois plasmídeos, e com as construções pP114CT e pP11SCT (proteína P do hRSV em fusão com as porções 114CT e 11SCT da *Split-NanoLuc* respectivamente), foram realizadas co-transfecções para análise da interação das proteínas através do ensaio de *Split-NanoLuc* (item 3.13 de Materiais e métodos).

À figura 27 na coluna 1 está apresentado o controle positivo para a interação entre monômeros da proteína P. À coluna 2 está apresentado o controle positivo, de interação entre as proteínas M2-1 e P do hRSV. À coluna 3 está apresentado o resultado obtido a partir da transfecção das construções descritas acima (pM2-1-114-CT e pYBX3-11S-CT). Valores acima da ordem de 3 unidades indicam interação específica.

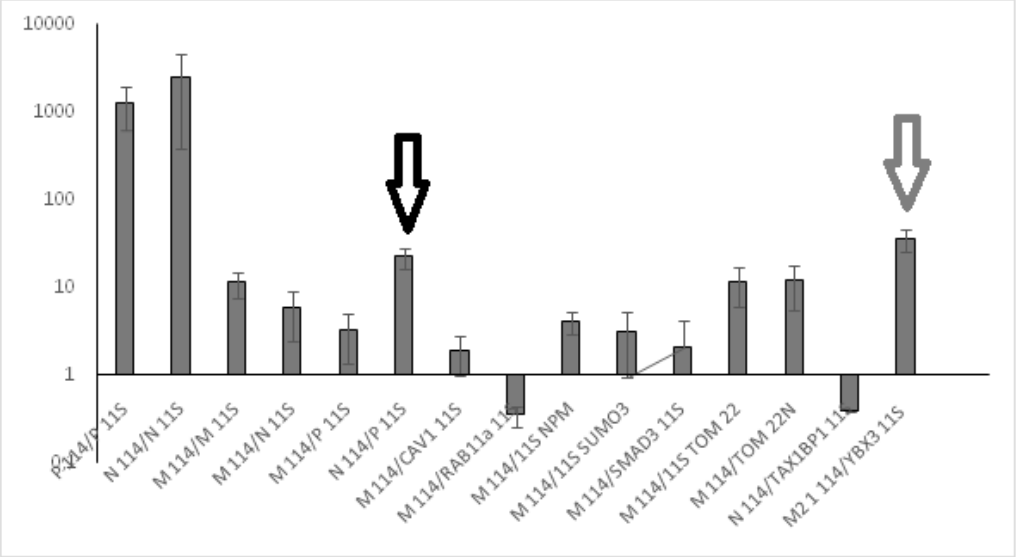
À figura 28 está apresentada uma repetição do experimento, comparando-o com diversas interações estudadas no laboratório do Dr. Eléouët, destacando as interações entre as proteínas virais N e P (seta contínua, controle positivo) e entre M2-1 e YBX3 (seta cinza). Este resultado é uma indicação adicional de interação entre M2-1 e YBX3.

Figura 27. Intensidade de luminescência em ensaio de *Split-NanoLuc*



A intensidade de luminescência (eixo vertical, escala logarítimica) foi identificada em ensaio de *Split-NanoLuc*. Coluna 1: P114-CT + P11S-CT (média). Coluna 2: M2-1 114-CT + P11S-CT. Coluna 3: M2-1 114-CT + YBX3-11S-CT (média). Metodologia apresentada no item 3.13.

Figura 28. Intensidade de luminescência em ensaio de Split-NanoLuc com maior diversidade de interações.

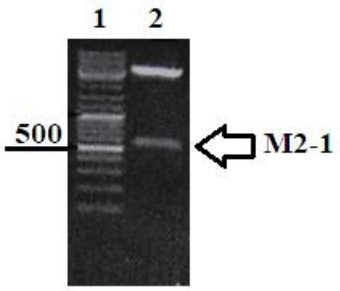


A intensidade de luminescência (eixo vertical, escala logarítimica) foi identificada em ensaio de *Split-NanoLuc*. Coluna 1: P 114 + P 11S (média). Coluna 2: N 114 + N 11S (média). Coluna 3: M 114 + M 11S. Coluna 4: M 114 + N 11S. Coluna 5: M 114 + P 11S. Coluna 6: N 114 + P 11S. Coluna 7: M 114 + CAV1 11S. Coluna 8: M 114 + RAB11a 11S. Coluna 9: M 114 + 11S NPM. Coluna 10: M 114 + 11S SUMO3. Coluna 11: M 114 + SMAD3 11S. Coluna 12: M 114 + 11S TOM 22. Coluna 13: M 114 + TOM 22N. Coluna 14: N 114 + TAX1BP1 11S. Coluna 15: M2-1 114 + YBX3 11S.

4.10 Construção dos vetores pM2-1-YFP2 e pHA-YBX3-YFP1 e ensaio de imunofluorescência indireta

Após o resultado positivo no ensaio de *Split-NanoLuc*, foi feita a construção dos vetores e pHA-YBX3-YFP1(Figura 15) e pM2-1-YFP2 (Figura 16), com a metodologia descrita no item 3.15. À figura 29, temos a confirmação da clonagem de M2-1 em pM2-1-YFP2. O objetivo inicial de fazer essas construções foi de confirmar a interação entre YBX3 e M2-1, através da reconstituição do sinal de fluorescência da proteína amarela (YFP), conforme comentado no item 3.14.

Figura 29. Digestão da construção pYFP2-M2-1.



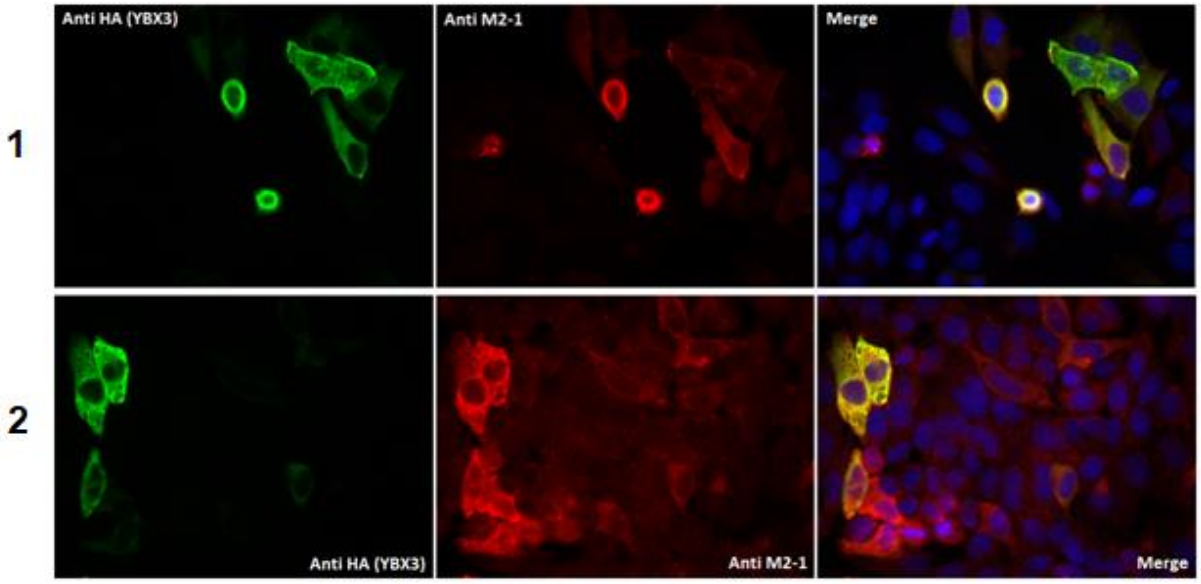
Está apresentado o gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). Amostras: 1: Marcador (100 bp DNA Ladder GBR), 2: pYFP2-M2-1 digerido com MluI e SalI.

Foram feitas as transfecções com os vetores construídos porém não foi possível identificar nenhum sinal da fluorescência da YFP (dados não apresentados). Optamos então pelo ensaio de imunofluorescência indireta, feito com as mesmas construções, para identificar a localização das proteínas M2-1 e HA-YBX3 nos contextos de transfecção e co-transfecção com pN e pP em células HEp-2.

Nos ensaios de imunofluorescência indireta (ver item 3.16), foram feitas as co-transfecções de pHA-YBX3-YFP1 e pM2-1-YFP2 e foi possível identificar que, quando co-transfectadas, HA-YBX3-YFP1 e M2-1-YFP2, na ausência das estruturas similares aos corpúsculos de inclusão (*IB like*), aparecem de forma dispersa no citoplasma (Figura 30).

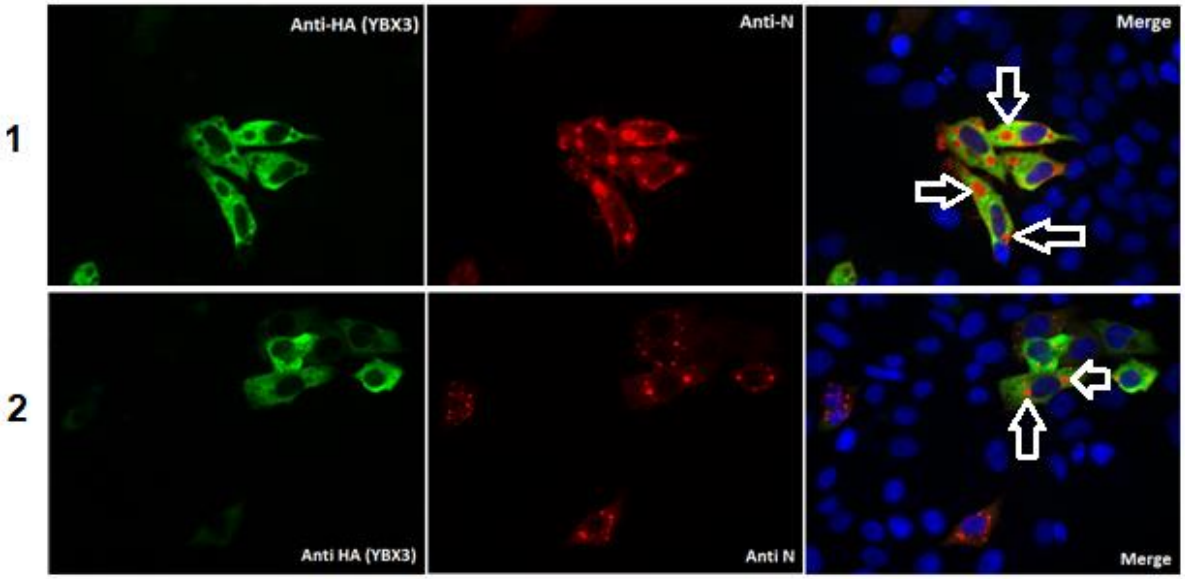
Quando HA-YBX3-YFP1 foi co-transfectada com N e P, porém na ausência de M2-1 (Figura 31), não foi possível identificar a presença de HA-YBX3-YFP1 nas *IB like*, sendo possível ver a HA-YBX3-YFP1 de forma dispersa no citoplasma nos dois campos apresentados (Figura 31, campos 1 e 2).

Figura 30. Imunofluorescência da co-expressão das proteínas HA-YBX3 e M2-1-YFP2



Análise por imunofluorescência da expressão das proteínas HA-YBX3-YFP1 (em verde) e M2-1-YFP2 (em vermelho) em células HEp-2. As células foram co-transfectadas com pHA-YBX3-YFP1 e pM2-1-YFP2. Estão apresentados dois campos de observação (1 e 2). Para a detecção da HA-YBX3-YFP1 foi utilizado o anticorpo primário *anti-HÁ* (Sigma) e o secundário *anti-mouse Alexa fluor 488*(Invitrogen). Para a detecção da M2-1-YFP2 foi utilizado o anticorpo primário *anti-M2-1*(Sigma) e o secundário *anti-rabbit Alexa fluor 568* (Invitrogen).

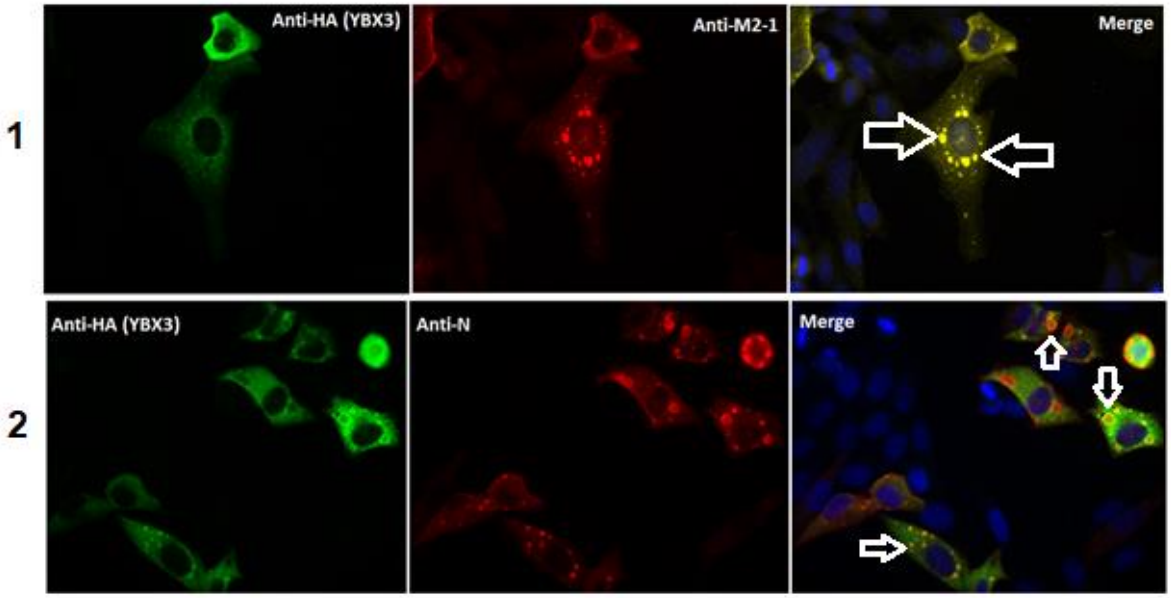
Figura 31. Imunofluorescência da co-expressão das proteínas HA-YBX3-YFP1, N e P.



Análise por imunofluorescência da expressão das proteínas HA-YBX3, M2-1, N e P em HEp-2. As setas brancas indicam as estruturas circulares semelhantes aos corpúsculos de inclusão. As células foram co-transfectadas com pHA-YBX3-YFP1 + pYFP2-vazio + pN + pP (ausência de M2-1).Estão apresentados dois campos (1 e 2, HA-YBX3-YFP1 em verde e N em vermelho). Para a detecção da HA-YBX3-YFP1 foi utilizado o anticorpo primário *anti-HA* (Sigma) e o secundário *anti-mouse Alexa fluor 488* (Invitrogen). Para a detecção da N foi utilizado o anticorpo primário *anti-N* (Sigma) e o secundário *anti-rabbit Alexa fluor 568* (Invitrogen).

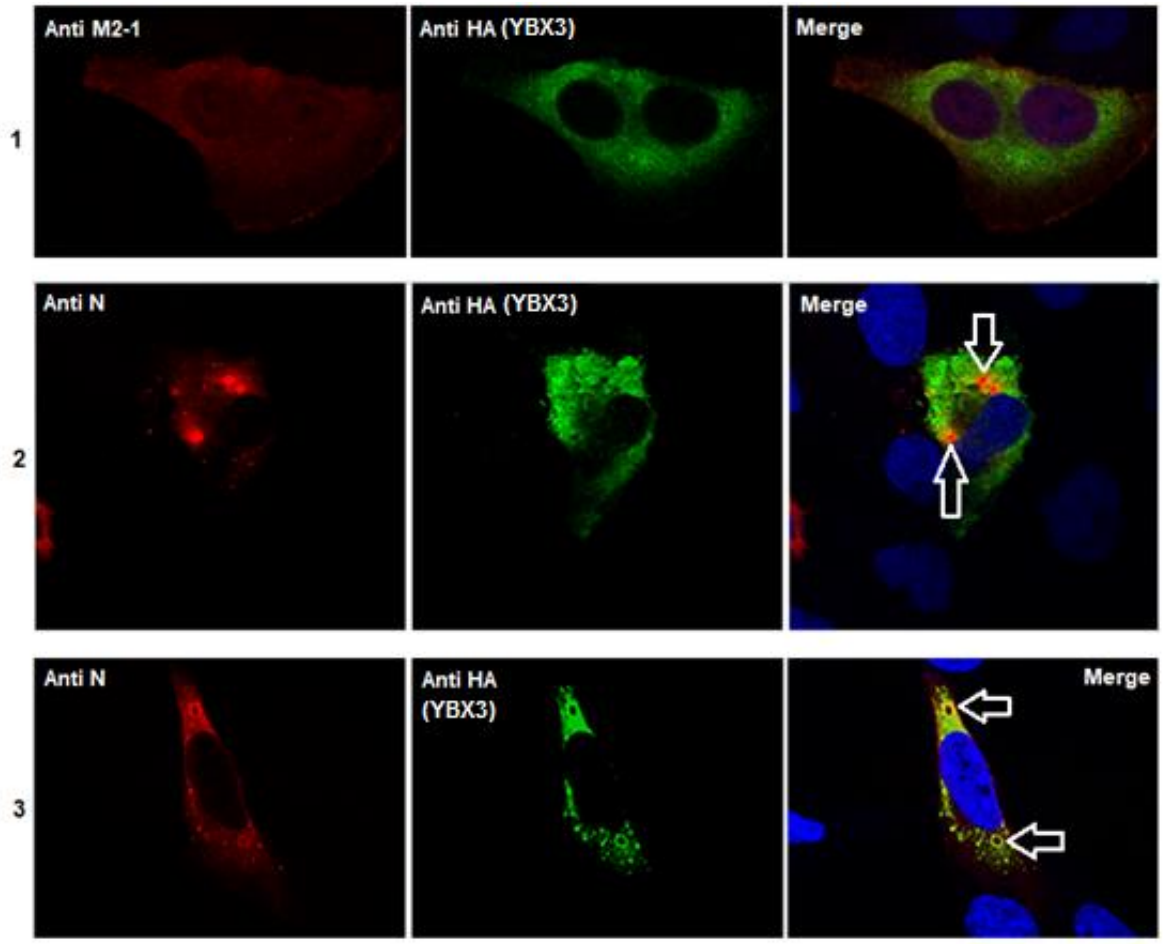
No contexto de co-transfecção de pYFP1-YBX3 + pYFP2-M2-1 + pN + pP, observamos a co-localização de HA-YBX3-YFP1 e pYFP2-M2-1 nas *IB like* (Figura 32, campo 1). Quando contrastada com anti-N, entretanto, a HA-YBX3-YFP1 aparece na região periférica das *IB like* (Figura 32, campo 2). Esse dado foi confirmado em experimento realizado pela Dra. Monika Bajorek, no INRA, em células BEAS-2B, com vetores que não expressam os domínios da YFP em fusão com HA-YBX3 e M2-1 (Figura 33).

Figura 32. Imunofluorescência da co-expressão das proteínas HA-YBX3-YFP1, M2-1-YFP2, N e P.



Análise por imunofluorescência da expressão das proteínas HA-YBX3-YFP1, M2-1-YFP2, N e P em HEp-2. As setas brancas indicam as estruturas circulares semelhantes aos corpúsculos de inclusão. As células foram co-transfectadas com pHA-YBX3-YFP1, pM2-1-YFP2, pN e pP.O campo 1 apresenta a HA-YBX3-YFP1 em verde e pM2-1-YFP2 em vermelho. O campo 2 apresenta a HA-YBX3-YFP1 em verde e a N em vermelho. Para a detecção da HA-YBX3-YFP1 foi utilizado o anticorpo primário *anti-HA* (Invitrogen) e o secundário *anti-mouse Alexa fluor 488* (Invitrogen). Para a detecção da M2-1-YFP2 foi utilizado o anticorpo primário *anti-M2-1* (Sigma) e o secundário *anti-rabbit Alexa fluor 568* (Invitrogen). Para a detecção da N foi utilizado o anticorpo primário *anti-N* (Sigma) e o secundário *anti-rabbit Alexa fluor 568* (Invitrogen).

Figura 33. Imunofluorescência da expressão das proteínas HA-YBX3, M2-1, N e P em células BEAS-2B.



Análise por imunofluorescência da expressão das proteínas HA-YBX3, M2-1, N e P em células BEAS-2B. 1: Expressão de HA-YBX3 (em verde) e M2-1 (em vermelho) em células BEAS-2B. 2: Expressão de HA-YBX3, N e P. 3: Expressão de pUC-57-HA-YBX3 , pcDNA-M2-1, pCDNA-N e pCDNA-P. Para a detecção da HA-YBX3, foi utilizado o anticorpo primário *anti-HA* (Sigma) e o secundário *anti-mouse Alexa fluor 488* (Invitrogen). Para a detecção da M2-1 foi utilizado o anti-M2-1 (Sigma) e o para a detecção de N, o anti-N (Sigma) e o secundário *anti-rabbit Alexa fluor 568* (Invitrogen).

4.11 Construção de vetores com os domínios de PABPC1

A identificação da proteína celular PABPC1 nas amostras de imunoprecipitação de FLAG-M2-1, FLAG-M2-1-CT e FLAG-N/M2-1/P (Tabelas 1, 2, 3 e 6) indica que, como YBX3, também tem um papel importante na funcionalidade dos IBs. Decidimos utilizar a metodologia de análise da interação com proteínas expressas em bactérias (ver item 3.17).

Optou-se por fazer as construções de PABP em vetores pGEX, para expressar os peptídeos em fusão com GST com o intuito de validar e dissecar sua interação com M2-1. Os

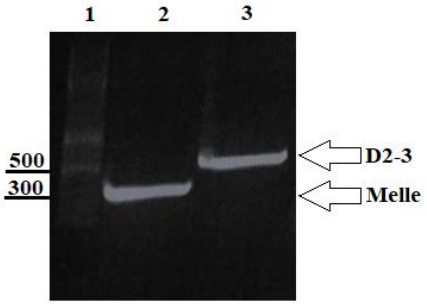
domínios da PABP estão apresentados à Figura 9 (item 1.6.5 da introdução), tendo sido feitas as construções dos vetores pGEX-GST-D1, pGEX-GST-D2-3 e pGEX-GST-MELLE (item 3.18, Figuras 18, 19 e 20 respectivamente).

Além do sequenciamento desses plasmídeos para verificar as subclonagens como detalhado nos itens de metodologia citados acima, foram feitas digestão de restrição de pGEX-GST-D1 (Figura 34), e reações de PCR com oligonucleotídeos específicos para pGEX-GST-D2-3 e pGEX-GST-MELLE (Figura 35), confirmando as construções.

Figura 34. Análise do plasmídeo pGEX-GST-D1.

A amostra foi corrida em gel de agarose 1% corado com *SYBR® Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen). 1: Marcador (*100 bp DNA Ladder GBR*). 2: pGEX-GST-D1 digerido com BamHI e XhoI.

Figura 35. PCR feita a partir das construções pGEX-GST-D2-3 e pGEX-GST-MELLE.



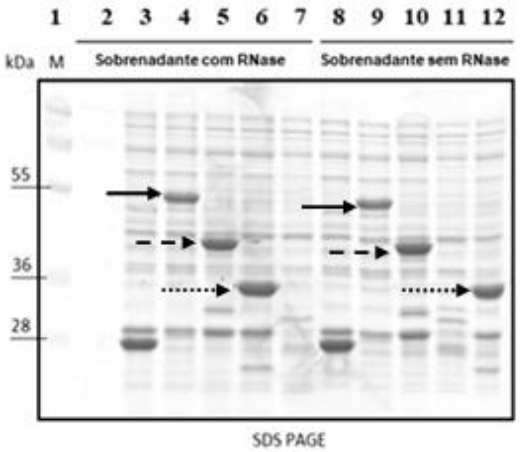
As amostras foram corridas em gel de agarose 1% corado com *SYBR® Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen). 1: Marcador (*100 bp DNA Ladder GBR*). 2: produto de PCR de pGEX-GST-MELLE. 3: Produto de PCR de pGEX-GST-D2-3.

4.12 Expressão de YBX3 ou dos domínios de PABPC1 em fusão com GST

A proteína também foi subclonada no vetor de expressão pGEX, gerando pGEX-GST-YBX3 (item 3.19). Isso foi feito com o intuito de confirmar através de mais uma metodologia a interação entre YBX3 e M2-1. Com as construções obtidas em pGEX, foram feitos experimentos para verificar a expressão de HA-YBX3 e dos domínios da PABPC1 em fusão com a GST.

A expressão foi feita em BL21 (ver item 3.20), com cada um dos plasmídeos separadamente, e os resultados apresentados à Figura 36, indicam a expressão de GST-D2-D3 (colunas 5 e 10) e MELLE (colunas 6 e 12), de acordo com os tamanhos esperados (cerca de 45 e 37 kDa's, respectivamente). No entanto, não foi possível identificar o tamanho correto para GST-D1 (colunas 4 e 9, tamanho esperado de 38 kDa). Também não foi possível verificar a expressão de YBX3 (colunas 7 e 11, aproximadamente 71 kDa). As setas contínuas indicam a GST-D1, as setas tracejadas a GST-D2-3 e as setas pontilhadas a GST-MELLE, na presença e ausência de RNase, devido ao fato de que YBX3, e D1 e D2-3 de PABP interagem com RNA, e sua degradação poderia afetar sua estabilidade e/ou interação com M2-1 que também liga RNA.

Figura 36. Expressão dos domínios da PABP e da YBX3 em BL21, efeito da RNase.

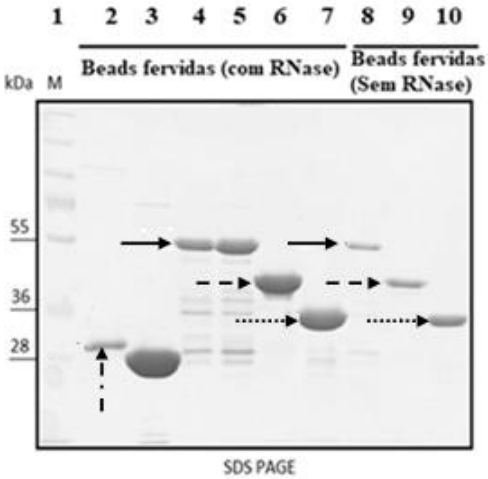


Gel de poliacrilamida 12% corado com *Comassie blue*, após os procedimentos descritos no item 3.20, com ou sem adição de RNase, como indicado. 1- Marcador de peso molecular; 2-Expressão de pGEX-vazio; 3- Expressão de pGEX-vazio (27 kDa); 4- Expressão de pGEX-GST-D1 (38 kDa); 5- Expressão de pGEX-GST-D2-3 (45 kDa); 6- Expressão de pGEX-GST-MELLE (37 kDa); 7- Expressão de pGE-HA-YBX3 (71 kDa); 8-Expressão de pGEX-vazio (27 kDa); 9- Expressão de pGEX-GST-D1 (38 kDa); 10- Expressão de pGEX-GST-D2-3 (45 kDa); 11- Expressão de pGEX-HA-YBX3 (71 kDa); 12- Expressão de pGEX-GST-MELLE (37 kDa).

4.13 Expressão e purificação dos domínios de PABP em fusão com a GST (com e sem RNAse) e incubação posterior com a M2-1 purificada

Foi feita a expressão dos domínios da PABP em BL21, de acordo com os procedimentos gerais descritos no item 3.20, com e sem RNase durante o procedimento de purificação, sendo que na etapa após a lavagem das *GS beads*, estas foram incubadas com a proteína M2-1 purificada. Os dados apresentados à Figura 37 não indicam que está havendo captura de M2-1 (28 kDa) no *pull down*.

Figura 37. Expressão dos domínios da PABP em BL21, com e sem RNase e posterior incubação com a M2-1 purificada.

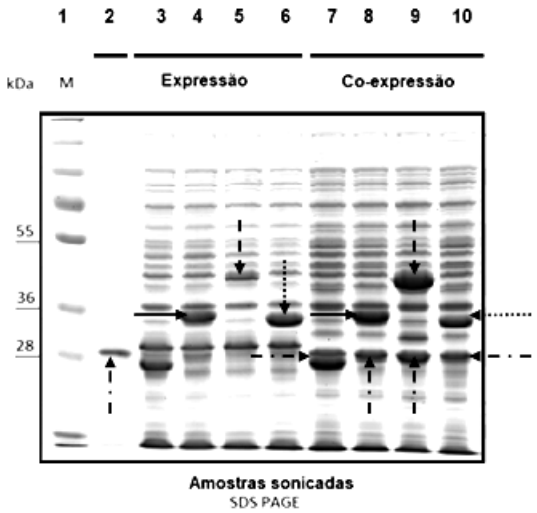


Gel de poliacrilamida 12% corado com *Comassie blue*, após os procedimentos descritos no item 3.20. 1- Marcador de peso molecular; 2- M2-1 purificada; 3-Expressão de pGEX-vazio ; 4- Expressão de pGEX-GST-D1; 5- Expressão de pGEX-GST-D1 ; 6- Expressão de pGEX-GST-D2-3; 7- pGEX-GST-MELLE; 8-Expressão de pGEX-GST-D1; 9- Expressão de pGEX-GST-D2-3. 10- Expressão de pGEX-GST-MELLE .

4.14 Co-expressão dos domínios da PABP com M2-1

Foi feita a expressão dos domínios da PABP e também sua co-expressão com His-M2-1 (utilizando pET-28-M2-1) em BL21, de acordo com o racional apresentado no item 3.17, e os procedimentos descritos no item 3.20 até o momento de sonicação das amostras, para verificar a expressão. De acordo com os dados à Figura 38, foi possível identificar a proteína M2-1 purificada (coluna 2), a expressão de GST-D1, agora com o tamanho esperado (coluna 4) e de GST-D2-3 e GST-MELLE (colunas 5 e 6) corretamente. Nas colunas 7, 8, 9 e 10, na altura aproximada de 28 kDa, foi possível identificar a expressão de M2-1 e dos domínios de PABPC1 nos seus respectivos tamanhos na etapa da purificação após a sonicação.

Figura 38. Expressão e co-expressão dos domínios da PABP e pET-28-M2-1 em BL21, amostras sonicadas.

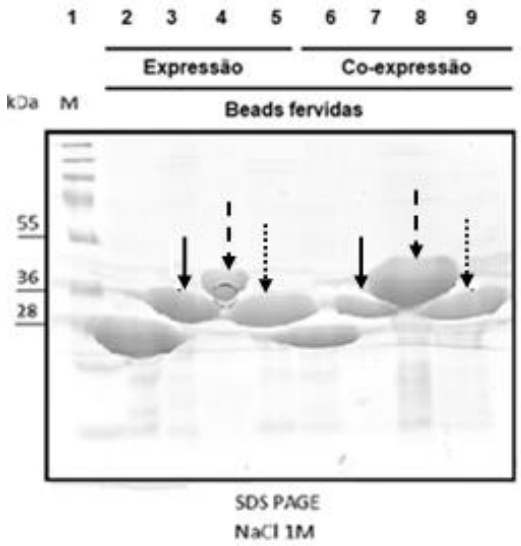


Gel de poliacrilamida 12% corado com *Comassie blue*, após os procedimentos descritos nos item 3.20 . 1- Marcador de peso molecular; 2- M2-1 purificada; 3-Expressão de pGEX-vazio; 4- Expressão de pGEX-GST-D1 ; 5- Expressão de pGEX-GST-D2-3; 6-Expressão de pGEX-GST-MELLE ; 7- Co-expressão de pGEX-vazio e pET-28-His-M2-1; 8- Co-expressão de pGEX-GST-D1 e pET-28-His-M2-1; 9- Co-expressão de pGEX-GST-D2-3 e pET-28-His-M2-1; 10- Co-expressão de pGEX-GST-MELLE e pET-28-His-M2-1.As setas contínuas indicam a GST-D1, as setas tracejadas a GST-D2-3, as setas pontilhadas a GST-MELLE e as setas traço-ponto a M2-1.

As amostras analisadas à Figura 38, foram tratadas com (Figura 39) ou sem (Figura 40) a adição de NaCl 1M durante o processo de *pull down*. Os dados apresentados à Figura 39, não indicam o *pull down* de M2-1 (28 kDa) pelos *GS beads*, em conjunto com os domínios da PABP (colunas 3, 4, 5, 7, 8 e 9), resultado esperado devido à dissociação provocada por alta concentração salina. As setas contínuas indicam a GST-D1, as setas tracejadas a GST-D2-3 e as setas pontilhadas a GST-MELLE.

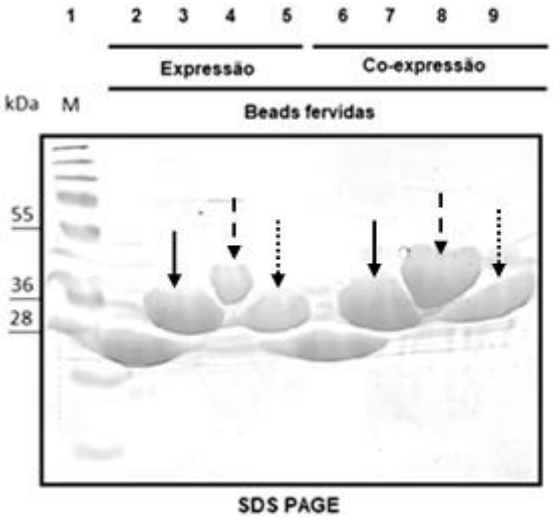
Os dados apresentados à Figura 39, também não indicam o *pull down* de M2-1 através dos *GS beads*, em conjunto com os domínios da PABP (colunas 3, 4, 5, 7, 8 e 9), apesar da visualização de bandas fracas nas colunas 8 e 9 na altura de 28 kDa. As setas contínuas indicam a GST-D1, as setas tracejadas a GST-D2-3 e as setas pontilhadas a GST-MELLE.

Figura 39. Co-expressão dos domínios da PABP e pET-28-M2-1 em BL21, pull down na presença de NaCl 1M.



Gel de poliacrilamida 12% corado com *Comassie blue*. 1- Marcador de peso molecular; 2- Expressão de pGEX-vazio; 3- Expressão de pGEX-GST-D1 ; 4- Expressão de pGEX-GST-D2-3 ; 5-Expressão de pGEX-GST-MELLE ; 6- Co-expressão de pGEX-vazio e pET-28-M2-1; 7- Co-expressão de pGEX-GST-D1 e pET-28-M2-1; 8- Co-expressão de pGEX-GST-D2-3 e pET-28-M2-1; 9- Co-expressão de pGEX-GST-MELLE e pET-28-M2-1.

Figura 40. Co-expressão dos domínios da PABP e pET-28-M2-1 em BL21, pull down na ausência de NaCl 1M.



Gel de poliacrilamida 12% corado com *Comassie blue*. 1- Marcador de peso molecular; 2- Expressão de pGEX-vazio; 3- Expressão de pGEX-GST-D1 ; 4- Expressão de pGEX-GST-D2-3 ; 5-Expressão de pGEX-GST-MELLE ; 6- Co-expressão de pGEX-vazio e pET-28-M2-1; 7- Co-expressão de pGEX-GST-D1 e pET-28-M2-1; 8- Co-expressão de pGEX-GST-D2-3 e pET-28-M2-1; 9- Co-expressão de pGEX-GST-MELLE e pET-28-M2-1.

5 DISCUSSÃO

Todo vírus ao multiplicar-se no interior de uma célula, necessariamente tem que fazer uma rede de interações com os componentes celulares para atingir esse objetivo. Assim, para entender melhor a replicação do hRSV, foi feita anteriormente no laboratório uma abordagem de co-imunoprecipitação com as proteínas M, N e P, que resultou na identificação de várias proteínas celulares que com elas interagem (OLIVEIRA et al 2013). É importante salientar que para a obtenção desses dados, essas proteínas foram expressas individualmente, em fusão com o peptídeo FLAG no amino terminal, e as proteínas celulares co-imunoprecipidadas identificadas (ver item 1.5).

As proteínas N e P fazem parte do complexo mínimo de transcrição do vírus, junto com a polimerase L e M2-1 (CARROMEU et al., 2007, ver item 1.2), e no sentido de avançar na complementação da caracterização das proteínas celulares que interagem com o complexo de transcrição viral, este trabalho objetivou analisar a proteína M2-1 e o complexo formado por M2-1/N/P.

Os dados obtidos, descritos em Resultados, levaram com sucesso à identificação de proteínas celulares que interagem com M2-1 e com o complexo formado por M2-1/N/P. Dentre elas, escolhemos fazer experimentos com PABPC1 e YBX3 para detalhar sua interação com M2-1, como discutido adiante.

5.1 Expressão de M2-1 e análises por espectrometria de massas

Inicialmente foi construído um vetor, pcDNA-FLAG-M2-1 (Figura 11), para expressar FLAG-M2-1 (FLAG em fusão no amino terminal), com o intuito de realizar experimentos de imunoprecipitação. Um ponto importante aqui é que foi utilizada a sequência otimizada para expressão em células humanas (item 3.2 de Material e Métodos). Essa otimização, como para N e P em dados anteriores do laboratório (SIMABUCO et al, 2009), foi efetiva para a funcionalidade desse vetor, tendo sido comprovada por ensaios de *western blot* (Figura 22) e imunofluorescência (Figura 23).

Ao serem co-expressas, N e P do hRSV formam estruturas semelhantes aos corpúsculos de inclusão (*IB like*, Figura 24, RINCHEVAL et al, 2017). Os corpúsculos de inclusão (IBs) formam-se no citoplasma durante a infecção (CARROMEU, 2007; COLLINS, MELERO 2011). No ensaio de imunofluorescência que apresentamos à Figura 25, foi possível identificar a co-localização de FLAG-M2-1 nos *IB like* em situação de co-transfecção com N e P. Esse achado indica uma validade funcional à participação de proteínas celulares

eventualmente associadas à FLAG-M2-1, no processo de replicação do hRSV, justificado o investimento em experimentos de co-imunoprecipitação e análise por espectrometria de massas.

Na imunoprecipitação realizada com FLAG-M2-1 (item 4.4, Tabelas 1 e 2), as principais proteínas celulares identificadas foram PABPC1, YBX3 e YBX1. Pelo descrito na literatura quanto a suas características (ver itens 1.6.4 e 1.6.5), a participação dessas proteínas na replicação do hRSV faz sentido.

Porém, tendo em conta que a região N terminal é importante para o dobramento da M2-1 (MELERO, 2007), foi testada também uma construção de M2-1 com o FLAG no C terminal da M2-1 (M2-1-FLAG-CT). Esse plasmídeo foi construído pela empresa GeneArt (item 3.5), já com a sequência codificadora sintetizada, otimizada para códons humanos. A expressão de M2-1-FLAG-CT foi atestada por *western blot* (não apresentado).

O resultado do experimento de imunoprecipitação de M2-1-FLAG-CT, item 4.5, indicou que as mesmas famílias de proteínas encontradas para FLAG-M2-1 foram encontradas nas proteínas co-imunoprecipitadas (Tabela 3). As principais proteínas identificadas foram PABP1, PABP3, PABP4, YBX1 e YBX3, confirmando a tendência de identificação dessas proteínas no contexto de co-imunoprecipitação com M2-1, e reforçando a possível validade funcional da participação dessas proteínas celulares na replicação do hRSV.

Relembrando, o objetivo geral deste trabalho foi expressar as proteínas virais do complexo de replicação N, P e M2-1, e realizar ensaios para identificar proteínas celulares interagentes com M2-1 individualmente ou com o conjunto dessas proteínas virais, e caracterizar essas interações. Como mencionado anteriormente, o trabalho de análise das proteínas celulares co-imunoprecipitadas individualmente com as proteínas N e P já havia sido feito (OLIVEIRA et al, 2013). No entanto, devemos considerar as diferenças metodológicas daquele e do presente trabalho. Aqui utilizamos a digestão em solução das proteínas co-imunoprecipitadas para análise por espectrometria de massas (ver itens 3.9 e 3.10). Naquele trabalho a abordagem foi de correr géis unidimensionais de SDS-PAGE, e cortar bandas de proteínas presentes nas amostras de imunoprecipitação, comparando-as a amostras de gel na mesma altura do controle. Essas amostras de gel é que foram sujeitas ao processo de digestão com protease para análise por espectrometria de massas (digestão em gel). Assim, repetimos as análises das co-imunoprecipitações com FLAG-N e FLAG-P.

Nas análises por espectrometria de massas de FLAG-N e de FLAG-P feitas neste trabalho (itens 4.6 e 4.7), a partir da digestão em solução das amostras, foi identificada Hsp70 (Tabelas 4 e 5), confirmando o resultado anterior. Entretanto, não houve identificação das

proteínas WDR77 e PRMT5 co-imunoprecipitadas com N, e de Tropomiosina 3 co-imunoprecipitada com P como em OLIVEIRA et al., 2013. Atribuímos essa diferença à metodologia distinta, ressaltando que naquele caso a banda de 70 kDa foi mais proeminente no gel unidimensional da co-imunoprecipitação de N e P (OLIVEIRA et al., 2013, ver dados suplementares). Isso pode ter levado ao mascaramento da detecção de outras proteínas no método de digestão em solução.

Com essas considerações, seguimos na análise feita a partir da co-transfeção do complexo contendo N, P e M2-1. O resultado da análise por espectrometria de massas das proteínas co-imunoprecipitadas com FLAG-N/P/M2-1 está apresentado à Tabela 6. As proteínas co-imunoprecipitadas individualmente com M2-1 (PABPC1, YBX3 e YBX1), ou N e P (Hsp70), foram identificadas. Adicionalmente, foi possível identificar as proteínas Hsp90, nucleofosmina e a sub-unidade pICln do metilossomo. Estas proteínas, bem como Hsp70, apareceram, ou têm correlatos identificados, em dois trabalhos anteriores: OLIVEIRA et al, 2013 comentado acima, e MUNDAY et al, 2015 que também envolveu a participação do nosso laboratório.

As proteínas PRMT5 (Proteína arginina metil transferase-5) e WDR77 (também denominada MEP50), são essenciais para a atividade do complexo metilossomo, e foram identificadas nas amostras de co-imunoprecipitação de FLAG-N (OLIVEIRA et al., 2013). Além disso, mais recentemente, foi caracterizado no laboratório que a própria proteína N é alvo de metilação em argininas, muito provavelmente por PRMT5 (OGAWA, 2016). No presente trabalho, em achado correlato, foi identificado um componente alternativo do complexo metilossomo que pode associar-se a PRMT5, a pICln (Tabela 6).

A subunidade pICln do metilossomo (Clns1a) é uma chaperona, que reconhecidamente se liga às proteínas Sm no citoplasma de células humanas, ordenando e regulando o agrupamento da maquinaria do spliceossomo (PESIRIDIS et al., 2009). Há evidências de que isso se dá através do recrutamento das Sm’s pela pICln para metilação por PRMT5 (que catalisa a dimetilação simétrica de argininas de proteínas alvo), permitindo o carreamento dessas proteínas para a formação das pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNA) (GUDERIAN et al., 2010). No caso do complexo de transcrição/replicação do hRSV, postulamos que pICIn poderia estar agindo também no recrutamento de PRMT5 para metilar N e/ou outras proteínas presentes nos IBs.

À Tabela 6, temos a identificação de nucleofosmina (NPM) dentre as proteínas co-imunoprecipitadas com o complexo FLAG-N/P/M2-1. A NPM é uma fosfoproteína que pertence à família nucleoplasmina de chaperonas, sendo que esta proteína exerce muitas das

suas funções no núcleo porém ela também pode se deslocar continuamente entre o núcleo e o citoplasma. Um número crescente de proteínas celulares foram descritas com a capacidade de interação com a nucleofosmina e, consequentemente, a NPM tem recebido um papel relevante em diversas funções celulares, incluindo a biogênese de ribossomos, a duplicação de centrosomos, o reparo do DNA e a resposta ao *stress* (COLOMBO et al., 2011).

Em OLIVEIRA et al., (2013), foi reportada a co-imunoprecipitação de NPM com a proteína de Matriz (M) expressa isoladamente, o que poderia indicar incoerência com o dado atual, pois M não foi co-expressa com o complexo FLAG-N/P/M2-1. No entanto, NPM foi detectada associada ao complexo de replicação formado pelo "sistema mini-genoma" (MUNDAY et al, 2015). O sistema mini-genoma consiste em expressar as proteínas L, P, N e M2-1 em conjunto com um mini-genoma que expressa uma proteína repórter (ex.: luciferase) cuja sequência codificadora é transcrita apenas por L por estar flanqueada por sinais *gene-start* e *gene-end*, contida entre as sequências *leader* e *trailer* (COLLINS et al, 1991, ver item 1.3).

A associação de NPM junto ao complexo de replicação em MUNDAY et al, 2015, foi vista pela utilização da proteína P modificada com inserção de EGFP na região amino não estruturada, na posição 32 (ver item 1.5, Figura 7). Essa fusão EGFP-P foi utilizada no lugar de P no sistema minigenoma, e anticorpos altamente específicos contra EGFP usados para co-imunoprecipitar o complexo de replicação e proteínas celulares associadas. NPM foi uma das proteínas selecionadas como interagente após a aplicação dos filtros de seleção (ver Tabela 2 em informações suplementares de MUNDAY et al., 2015).

Foi visto que tanto o vírus da hepatite C em MAI et al., (2006), quanto o adenovirus em BEVINGTON et al., (2007) recrutam a NPM durante seus processos de replicação e montagem. Com o resultado aqui apresentado, podemos postular que NPM teria uma atividade organizacional ao nível dos IBs por tratar-se de uma estrutura ribonucleo-proteica. Isso não é incompatível com a associação de NPM a M vista em OLIVEIRA et al., (2013), que nesse caso estaria atuando ao nível da montagem da partícula viral, também uma estrutura ribonucleo-proteica.

À Tabela 6, temos também a identificação da proteína Hsp90 que é reconhecida como um das mais abundantes chaperonas, sendo importante para diversos processos celulares, tais como a transdução de sinal, o transporte intracelular e a degradação de proteínas (LI; BUCHNER, 2012). A Hsp90 também é importante no contexto de resposta celular ao *stress* e tem função essencial na homeostase celular (JACKSON, 2012).

Em MUNDAY et al, (2015), o objetivo foi analisar o interactoma de hRSV. Um

conjunto de chaperonas celulares apresentou maior representatividade nos achados de co-imunoprecipitação com L e P (sistema minigenoma), seguidos por análise de espectrometria de massas. Dentre elas foi feita análise mais detalhada de Hsp90 e Hsp70, e demonstrado que têm papel importante na replicação viral, utilizando inibidores específicos dessas chaperonas. Assim a identificação de Hsp70 e Hsp90 nos dados aqui apresentados é bastante significativa, pois estão sendo detectadas associadas a N/P/M2-1, um complexo mais simples, em comparação ao daquele trabalho que tem adicionalmente L e um minigenoma. Isso nos dá subsídios para considerar as demais interações que encontramos como significativas.

Tendo em conta que essas proteínas apresentaram um alto *score* na análise por espectrometria de massas, foi considerada a possibilidade de que experimentos posteriores fossem focados na análise da interação entre a M2-1 com YBX3 e PABPC1, já que essas proteínas fazem parte das duas principais famílias de proteínas (as *poly-(A)-binding proteins*e as *Y-box binding proteins*) que se ligam ao mRNA no citoplasma de células somáticas (MATSUMOTO; WOLFEE, 1998).

5.2 Ensaios de Split-NanoLuc para a análise da interação entre M2-1 e YBX3

Para analisar a interação de M2-1 com YBX3 decidimos utilizar a abordagem experimental de *Split-NanoLuc*. Esses experimentos foram feitos em colaboração com o grupo do Dr. Jean-François Eléouet, no Institut National de La Rechérche Agronomique, unidade de Jouy-en-Josas, França, durante um período de estágio. Essa metodologia é interessante para testar interações proteína-proteína em células, pois são obtidos enovelamento e modificações pós-tradução mais próximos do contexto real (DIXON et al., 2015).

Como descrito no item 4.9, foi feita a construção do vetor pCIneo-YBX3-11SCT, que foi utilizado em conjunto com o vetor pCIneo-M2-1-114-CT construído no laboratório do Dr. Eléouet. Esses vetores expressam segmentos da enzima NanoLuc, que ao serem colocados em contato são capazes de clivar um substrato e gerar luminescência.

As intensidades de luminescências apresentadas nas figuras 27 e 28, correspondem à NLR, taxa de fluorescência normalizada com relação aos controles. A NLR foi obtida a partir do cálculo onde o valor de fluorescência obtido (por exemplo, nas células transfectadas com os plasmídeos que expressam M2-1-114CT e YBX3-11SCT), foi dividido pela soma dos valores de fluorescência obtidos nos controles (transfecções de pCIneo-YBX3-11SCT com o vetor vazio pCIneo-114CT, e de M2-1-114CT com o vetor vazio-11XCT) (CASSONET et

al., 2011). Assumimos que NLR superiores ao valor 3 representam uma interação específica, tendo por base estudos de interações vírus-célula para Influenza, onde foram identificadas várias interações e este valor de NLR foi estabelecido como significativo (MUNIER et al., 2013).

À Figura 27 temos o resultado de um experimento comparando um controle positivo para a interação entre monômeros da proteína P (coluna 1), outro controle positivo de interação entre as proteínas M2-1 e P (coluna 2), e a interação entre M2-1 e YBX3 (coluna 3).Todos os valores estão acima de 3 unidades, indicando interação.O resultado obtido indica que o valor médio de luminescência obtido na interação entre M2-1-114CT e YBX3-11SCT foi superior ao valor de luminescência obtido entre as proteínas virais M2-1 e P, que reconhecidamente interagem através do *core domain* da M2-1 (Figura 5) ligando à P (BAILLY et al., 2016). Assim, temos uma forte indicação de interação positiva entre M2-1 e YBX3.

À Figura 28 está apresentado outro experimento comparando resultados de diversas construções, feitas no laboratório do Dr. Eléouet, co-transfectadas. Nesse painel temos vários controles positivos, destacando a interação entre as proteínas virais N e P (seta preta), dois controles negativos (valores abaixo da abscissa), e a interação entre M2-1 e YBX3 (seta cinza). Este resultado reforça a indicação de interação entre M2-1 e YBX3 utilizando a técnica *de Split-NanoLuc*.

5.3 Ensaios de imunofluorescência para a análise da interação entre M2-1 e YBX3

No sentido de confirmar a interação entre M2-1 e YBX-3, investimos em outro ensaio de complementação, a reconstituição do sinal de fluorescência da proteína amarela (YFP). Para tanto foram construídos os vetores pHA-YBX3-YFP1 (Figura 15) e pM2-1-YFP2 (Figura 16), conforme comentado no item 3.2.4. O ensaio, no entanto, não funcionou (dados não apresentados, item 4.10), o que pode ter ocorrido devido a conformação inadequada de YPF1/2, impedindo a complementação.

Resolvemos então utilizar esses vetores para verificar se M2-1 e YBX3 co-localizam pois temos o tag HA no amino terminal de YBX3 (pHA-YBX3-YFP1), permitindo a utilização de anticorpos primários anti-HA e anti M2-1. Num primeiro experimento, foi possível verificar, que quando HA-YBX3-YFP1 e M2-1-YFP2 são expressas na ausência de estruturas semelhantes a corpúsculos de inclusão (*IB like*, formados por N/P), aparecem de forma dispersa no citoplasma, havendo regiões de sobreposição (Figura 30).

Quanto HA-YBX3-YFP1 e M2-1-YFP2 são expressas na presença dos *IB like*, temos

um resultado interessante. A HA-YBX3-YFP1 continua dispersa no citoplasma e fica excluída dos IBs (Figura 31).

No contexto da co-transfecção M2-1-YFP2/N/P/HA-YBX3-YFP1, verificamos a localização de M2-1-YFP2 nos *IB like* (Figura 32, campo 1). Isso é esperado, pois é reconhecido que o processo de transcrição ocorre nos IBs e M2-1 atua em conjunto com a polimerase viral (TANG et al., 2001). Surpreendentemente nesse contexto, observa-se a co-localização entre M2-1-YFP2 e HA-YBX3-YFP1 nos *IB like* (Figura 32, campo 1). Quando contrastada com a localização de N, entretanto, HA-YBX3-YFP1 aparece na região periférica das *IB like* (Figura 32, campo 2). Isso indica que M2-1 recruta YBX3 para os *IB like* formando uma região de interação localizada na superfície dessa estrutura.

Nesse conjunto de dados, no entanto, temos tanto M2-1 quanto YBX3 em fusão com segmentos da YFP, o que pode estar interferindo no fenômeno. O experimento foi repetido mais recentemente pela Dra. Monika Bajorek, no laboratório do Dr. Eléouet, com vetores que não expressam os domínios da YFP em fusão com HA-YBX3 ou M2-1. Como pode ser visto à Figura 33, houve uma reprodução do padrão: no campo 1, temos as proteínas HA-YBX3 e M2-1 dispersas; no campo 2 HA-YBX3 na presença de N/P fica fora dos *IB like*; e no campo 3 HA-YBX3 na presença de M2-1/N/P aparece na região periférica dos *IB like*. Este dado é importante pois foi obtido em outra linhagem celular reforçando a indicação de que M2-1 recruta a YBX3 para os *IB like*.

5.4 Interação entre PABPC1 e M2-1 expressas em bactérias

Para estudar as interações PABC1 e M2-1, optamos por expressar essas proteínas, em bactérias purificando-as e olhando para sua interação *in vitro*, ou através de estratégia de co-expressão em bactérias, utilizada anteriormente pelo grupo do Dr. Éleouet (GALLOUX et al., 2012, GALLOUX et al., 2015, e itens 3.17 e 3.20). Para tanto os domínios funcionais de PABPC1 foram sub-clonados no vetor pGEX (ver itens 3.18 e 4.11). Tentamos utilizar a mesma estratégia para YBX3, também subclonando-a em pGEX (ver item 3.19), porém não obtivemos sucesso na expressão (Figura 36, item 4.12).

Assim, essas estratégias experimentais foram utilizadas apenas com os domínios da PABPC1, cuja expressão foi bem sucedida (Figura 36, item 4.12), com o intuito de validar e dissecar sua interação com M2-1, expressa com o vetor pET-28-His-M2-1 (item 3.20).

A primeira estratégia que tentamos foi de purificar as *GS beads* associadas com os peptídeos compostos pelos domínios de PABPC1 em fusão com GST, tratadas ou não com RNAse (item 4.13), e coloca-las para interagir com M2-1 *in vitro*. Se ocorresse interação

proteína-proteína, veríamos M2-1 no *pull down* de amostras tratadas com RNAse. Se ocorresse a interação através da ligação dos dois peptídeos a RNA, veríamos M2-1 no *pull down* de amostras não tratadas com RNAse. O resultado apresentado à Figura 37 mostra que não houve *pull down* de M2-1 em nenhum caso, indicando que esta estratégia experimental não respondeu à questão.

Tentamos então a estratégia de co-expressão dos dois peptídeos (estariam presentes no mesmo lisado bacteriano), seguida de *pull down* com *GS beads* (ver item 4.14). Verificamos primeiro se nos lisados bacterianos estavam presentes os dois peptídeos (uma das fusões GST-domínios de PABPC1 e His-M2-1), e à Figura 38 constatamos que a co-expressão ocorreu como esperado.

Essas amostras foram tratadas com NaCl 1M durante o processo de *pull down*. Os dados apresentados à Figura 39 não indicam o *pull down* de M2-1 pelos *GS beads*, em conjunto com os domínios da PABP, resultado esperado devido à dissociação provocada por alta concentração salina.

As mesmas amostras, sem tratamento com NaCl 1M durante o processo de *pull down*, foram analisadas. Os dados apresentados à Figura 40, também não indicam o *pull down* de M2-1 através dos *GS beads*, em conjunto com os domínios da PABP. Esse resultado indica que não ocorreram interações em baixa concentração salina.

É reconhecido que a alta concentração de sal, durante o processo de purificação de proteínas, tem a capacidade de suprimir as interações iônicas (ATHAVALE et al., 2010) sendo então este procedimento adotado para garantir que as proteínas purificadas não estariam associadas com RNA ou entre si, tendo em conta que os RRM's da PABPC1 têm a características de se ligar às fitas simples de RNA (LI etal., 2014).

Sabe-se que a PABP1 é uma proteína que recebe diversas modificações pós-traducionais, tais como a dimetilação de argininas e lisinas, acetilação de argininas, e as não usuais metilações de ácido glutâmico e de asparagina. Isso afeta o ponto isoelétrico da PABP1 (pH 9.52 na proteína não modificada) permitindo sua distribuição em células HeLa em compartimentos que têm o pH entre 7.6 e 10, mostrando um comportamento compatível com as consequências estruturais provocadas por essas modificações pós-traducionais (BROOK et al., 2012).

As modificações pós-traducionais de proteínas determinam as suas estruturas terciárias e quaternárias e também podem regular as suas atividades e funções (SEO; LEE, 2004), sendo assim, podemos especular que a ausência dessas modificações, no contexto de expressão de proteínas em bactérias, podem ser as responsáveis pela não-identificação da interação da His-

M2-1 com os domínios da PABPC1.

Finalmente, com relação a essa interação devemos mencionar dados recentes em que foi feita uma análise detalhada da estrutura dos IBs, utilizando além de microscopia confocal também a técnica de imageamento de super resolução (RINCHEVAL et al., 2017). Nesse trabalho foi caracterizado que os mRNAs virais concentram-se nos IBs organizados em subestruturas internas, e a eles estão associadas M2-1 e PABP. Isso indica a validade do nosso achado de co-imunoprecipitação, porém acabamos não conseguindo definir como essa interação ocorre, utilizando as estratégias de expressão em bactérias discutidas acima.

6 CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados permitem as seguintes conclusões:

- O gene de M2-1 otimizado foi sub-clonado no vetor pcDNA-FLAG e expressou eficientemente a proteína de fusão FLAG-M2-1.

- A proteína de fusão FLAG-M2-1 co-localiza nos *IB like* formados pela co-expressão de N e P.

- As proteínas celulares co-imunoprecipitadas com FLAG-M2-1, identificadas por espectrometria de massas, foram: *poly(A)-binding protein cytoplasmic 1* (PABPC1), *Y-box binding protein 3* (YBX3), e *Nuclease-sensitive element-binding protein 1* (YBX1).

- O complexo FLAG-N/P/M2-1 co-imunoprecipitou as proteínas celulares: Hsp70, Hsp90 (*Heat shock proteins 70* e *90*), Npm (*Nucleophosmin*), PABPC1, YBX1, YBX3, e a sub-unidade pICIn do metilossomo.

- A interação de YBX3 com M2-1 foi corroborada em ensaios de complementação de proteína fragmentada (*Split-NanoLuc*), e de co-localização nos *IB like* por imunofluorescência indireta.

REFERÊNCIAS*

ATHAVALE, S. S.; OUYANG, W.; MCPIKE, M. P.; HUDSON, B. S.; BORER, P. N. Effects of the Nature and Concentration of Salt on the Interaction of the HIV-1 Nucleocapsid Protein with SL3 RNA. **Biochemistry**, v. 49, n. 17, p. 3525-3533, 2010.

AUSUBEL, F. M. et al. **Current Protocols in Molecular Biology**, New York: John Wiley & Sons, 1994.

BAILLY, B. et al. Targeting human respiratory syncytial virus transcription anti-termination factor M2-1 to inhibit in vivo viral replication. **Nature Scientific Reports**, v. 6, n. 25806, p. 1-11, 2016.

BAKKER, S. E. et al. The Respiratory Syncytial Virus Nucleoprotein–RNA Complex Forms a Left-handed Helical Nucleocapsid. **Journal of General Virology**, v. 94, p. 1734-1738, 2013.

BERGKESSEL, M.; GUTHRIE, C. Chapter twenty five – Colony PCR. In: **Methods in Enzymology**, Elsevier, p. 299-309, 2013.

BERNSTEIN, P.; ROSS, J. Poly(A), poly(A) binding Protein and the Regulation of mRNA Stability. **Elsevier Science Publishers Ltd UK**, v. 0379, p. 373-377, 1989.

BEVINGTON, J. M.; NEEDHAM, P. G. VERRILL, KC, COLLACO, RF, BASRUR, V, TREMPE, JP. Adeno associated virus interactions with B23/Nucleophosmin: Identification of sub-nucleolar virion regions. **Virology**, v. 357, n. 1, p. 102–13, 2007.

BLONDOT, M-L. et al. Structure and Functional Analysis of the RNA- and Viral Phosphoprotein-Binding Domain of Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 5, e1002734. doi:10.1371/journal.ppat.1002734, 2012.

BOHMWALD, K. et al. Human Respiratory Syncytial Virus: Infection and Pathology. **Seminars in Respiratory And Critical Care Medicine**, v. 37, p. 522-537, 2016.

BOLLAG, D. M.; ROZYCKI, M. D.; EDELSTEIN, S. J. **Protein Methods. 2. Ed,** New York: Wiley-liss, 1996.

BOUTE, N. et al. NanoLuc Luciferase – A Multifunctional Tool for High Throughput Antibody Screening. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. 27, p. 1-11, 2016.

BROOK, M. et al. The multifunctional poly (A)-binding protein (PABP) 1 is subject to extensive dynamic post-translational modification, which molecular modeling suggests plays an important role in co-ordinating its activities. **Biochemistry Journal**, v. 441, p. 803-812, 2012.

BROWN, G. et al. Evidence for an association between heat shock protein 70 and the respiratory syncytial virus polymerase complex within lipid-raft membranes during virus infection. **Virology**, v. 338, n. 1, p. 69-80, 2005.

-*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BUCHNER, J.; LI J. Structure, Function and Regulation of the Hsp90 Machinery. **Biomed J**, v. 36, n. 3, p. 106-117, 2013.

AFONSO, C. L. et al. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. **Virology Division News**, p. 2351–2360, 2016.

CANEDO-MARROQUIN, G. et al. Modulation of host immunity by human respiratory syncytial virus virulence factors: a synergic inhibition of both innate and adaptative immunity. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology,** v. 7, n. 367, p. 1-10, 2017.

CARROMEU, C**. Estudos de Caracterização Estrutural, Localização Intracelular e Imunogenicidade da RNA Polimerase do Vírus Respiratório Sincicial Humano**. 128 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Interunidades em Biotecnologia – Universidade de São Paulo / Instituto Butantan / Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 2007.

CARTEE, T. L.; WERTZ, G. W. Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Requires Phosphorylation for Efficient Function and Binds Viral RNA during Infection. **Journal of Virology**, v. 75, n. 24, p. 12188-12297, 2001.

CASSONNET, P. et al. Benchmarking a luciferase complementation assay for detecting protein complexes. **Nature Methods**, v. 8, n.12, p. 990-992, 2011.

CECCARELLI, E. A.; ROSANO, G. L. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 172, p. 1-17, 2014.

CHATERJEE, D. B.; ESPOSITO, D. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, p. 353-358, 2006.

COLOMBO, E.; ALCALAY, M.; PELICCI, P. G. Nucleophosmin and its complex network: a possible therapeutic target in hematological diseases. **Oncogene**, v. 30, p. 2595-2609, 2011.

DAVIES, H. G. et al. A Sequence-Specific RNA Binding Complex Expressed in Murine Germ Cells Contains MSY2 and MSY4. **Developmental Biology**, v. 221, p. 87-100, 2000.

DIXON, A. S. et al. NanoLuc Complementation Report Optimized for Accurate Measurement of Proteins Inteactions in Cells. **ACS Chemical Biology**, v. 11, p. 400-408, 2016.

DURFEE, T. et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhouse. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 7, p. 2597-2606, 2008.
CANE, P. Molecular Epidemiology and Evolution of HRSV. In: CANE P (Edit.). Perspectives in Medical Virology: **Respiratory Syncytial Virus. Elsevier**, p. 89-113, 2007.

COLLINS, P. L.; FEARNS R. Role of the M2-1 Transcription Antitermination Protein of Respiratory Syncytial Virus in Sequencial Transcription. **Journal of Virology**, v. 73, n. 7, p. 5852-5864, 1999.

COLLINS, P. L.; MELERO J. A. Progress in Understanding and Controling Respiratory Syncytial Virus: Still Crazy After All These Years. **Virus Research**, v. 162, p. 80-99, 2011.

COLLINS, P. L.; MINK, M. A.; STEC, D. S. Rescue of synthetic analogs of respiratory syncytial virus genomic RNA and effect of truncations and mutations on the expression of a foreign reporter

gene. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, n. 21, p. 9663-9667, 1991.

DERRY, M. C.; YANAGIYA, A.; MARTINEAU, Y.; SONENBERG N. Regulation of Poly(A)-binding Protein through PABP-interacting Proteins. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. LXXI, p. 537-545, 2006.

ELISEEVA, I. A. et al. Y_Box_Binding Protein 1 (YB_1) and Its Functions. **Biochemistry (Moscow)**, v. 76, n. 13, p. 1402-1433, 2011.

ELISEEVA, I. A.; LYABIN, D. N.; OVCHINNIKOV, L. P. Poly(A)-Binding Proteins: Structure, Domain Organization, and Activity Regulation. **Biochemistry (Moscow)**, v. 78, n. 13, p. 1377-1391, 2013.

FEARNS, R.; COLLINS, P. L.; Model for Polymerase Access to the Overlapped L Gene of Respiratory Syncytial Virus. **Journal of Virology**, v. 73, p. 388-397, 1999.

FIX, J.; GALLOUX, M.; BLONDOT, M.; ELÉOUËT, J-F. The Insertion of Fluorescent Proteins in a Variable Region of Respiratory Syncytial Virus L Polymerase Results in Fluorescent and Functional Enzymes But with Reduced Activities. **The Open Virology Journal**, v. 5, p. 103-108, 2011.

GALLOUX, M. et al. Identification and Characterization of the binding Site of the Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein to RNA-Free Nucleoprotein. **Journal of Virology**, v. 89, n. 7, p. 3484-3496, 2015.

GALLOUX, M. et al. Characterization of a Viral Phosphoprotein Binding Site on the Surface of the Respiratory Syncytial Nucleoprotein. **Journal of Virology**, v. 86, n. 15, p. 8375-8387, 2012.

GARCIA-CANTON, C.; MINET, E.; ANADON, A.; MEREDITH, C. Metabolic characterization of cell systems used in in vitro toxicology testing: Lung cell system BEAS-2B as a working example. **Toxicology in vitro**, v. 27, p. 1719-1727, 2013.

GARCIA, J.; GARCIA-BARRENO, B.; VIVO, A.; MELERO, J. A. Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that co express the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22 K protein. **Virology,** v. 195, p. 243–247, 1993.

GRAHAM, F. L. et al. of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **Journal of General Virology**, v. 36, p. 59-74, 1977.

GRAY N. K. et al. Poly(A)-binding proteins and mRNA localization: who rules the roost?. **Biochemical Society Transactions**, v. 43, n. 6, p. 1277-1284, 2015.

GRIFFITHS, C.; DREWS, S. J.; MARCHANT, D. J. Respiratory syncytial virus: infection, detection and new options for prevention and treatment. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, p. 277-319, 2017.

GUDERIAN, G. et al. RioK1, a New Interactor of Protein Arginine Methyltransferase 5 (PRMT5), Competes With pICln for Binding and Modulates PRMT5 Complex Composition and Substrates Specificity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 3, p. 1976-1986, 2011.

HORSTMAN A. et al. A cautionary note on the use o split-YFP/BiFC in plant protein-protein Interaction studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 9628-9643, 2014.

IZUMI, H. et al. Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'-> 5'exonuclease activity. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 5, p. 1200-1207, 2001.

JACKSON, S. E. Hsp90: Structure and Function in Molecular Chaperones. **Molecular Chaperones**. p155-240, 2012.

KISS, G. et al. Structural Analysis of Respiratory Syncytial Virus Reveals the Position of M2-1 between the Matrix Protein and the Ribonucleoprotein Complex. **Journal of Virology**, v. 88, n.13, p. 7602-7617, 2014.

LASHAM, A. et al. YB-1: Oncoprotein, Prognostic Marker and Therapeutic Target? **Biochem J**, v. 449, p. 11-23, 2013.

LIFLAND, A. W. et al. Human respiratory syncytial virus nucleoprotein and inclusion bodies antagonize the innate immune response mediated by MDA5 and MAVS.**J Virol**, v. 86, n. 15, p. 8245-58, 2012.

LIN, Y-C. et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. **Nature Communications**, v. 5, n. 4767, p. 1-12, 2014.

LI, X.; KAZAN, H.; LIPSHITZ, H. D.; MORRIS, Q. D. Finding the target sites of RNA-binding proteins. **Wires RNA**, v. 5, p. 111-130, 2014.

LLORENTE, M. T. et al. Structural properties of the human respiratory syncytial vírus P protein: Evidence for an elongated homotetrameric molecule that is the smallest orthologue within the family of paramyxovirus polymerase cofactors. **Proteins**, v. 72, p. 946-958, 2008.

LU, Z. H.; BOOKS, J. T.; LEY, T. J. Cold Shock Domain Family Members YB-1 and MSY4 Share Essential Functions during Murine Embryogenesis. **Mol Cell Biol**, v. 26, p. 8410- 8417, 2006.
LYABIN, D. N.; ELISEEVA, I. A.; OVCHINNIKOV, L. P. YB-1 Protein: Functions and Regulation.Willey Interdisciplinary. **WIREs RNA**, v. 5, p. 95–110, 2014.

MAI, R. T. et al. Hepatitis C virus core protein recruits nucleolar phosphoprotein B23 and coactivator p300 to relieve the repression effect of transcriptional factor YY1 on B23 gene expression. **Oncogene**, v. 25, p. 448–462, 2006.

MALASAO, R. et al. Molecular Characterization of Human Respiratory Syncytial Virus in the Philippines, 2012-2013. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. 1-22, 2015.

MASTRANGELO, M-A.; KLEENE, K. C. Cold shock domain-containing protein A. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, n. 9, p. 779-788, 2000.

MATSUMOTO, K.; WOLFEE, A. P. Gene regulation by Y-box proteins:coupling control of transcription and translation. **Trends in cell biology**, v. 8, p. 318-323, 1998.

MCDONALD, T. P. et al. Evidence that the Respiratory Syncytial Virus Polymerase Complex

Associates with Lipid Rafts in Virus-infected Cells: a Proteomic Analysis. **Virology**, v. 330, p. 147-157, 2004.

MELERO, J. A. Molecular Biology of Human Respiratory Syncytial Virus. In: CANE P (editor). Perspectives in Medical Virology: Respiratory Syncytial Virus. **Elsevier**, p. 01-30, 2007.

MITRA, R. et al. The human respiratory syncytial virus matrix protein is required for maturation of viral filaments. **J Virol**, v. 86, p. 4432-4443, 2012.

MUNIER, S. et al. Exploration of Binary Virus-Host Interactions Using an Infectious Protein Complementation Assay. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 12, n.10, p. 2845-2855, 2013.

OHNO, A. et al. Characterization of Human Respiratory Syncytial Virus Detected in Hospitalized Children in Philipines from 2008 to 2012. **Journal of Clinical Virology**, v. 53, p. 59-65, 2013.

OLIVEIRA, A. P. **Caracterização da nucleoproteína e fosfoproteína do vírus respiratório sincicial humano quanto suas propriedades imunogênicas e de interação com proteínas celulares.** 2013. 161p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

OLIVEIRA, A. P. et al. Human respiratory syncytial virus N, P and M protein interactions in HEK-293T cells. **Virus Research**, v. 177, n. 1, p. 108–112, 2013.

PESIRIDIS, G. S.; DIAMOND, E. ; DUYNE, G. D. V. Role of pICln in Methylation of Sm Proteins by PRMT5. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 32, p. 21347-21359, 2009.

PRELICH, G. Gene Overexpression: Uses, Mechanisms and Interpretation. **Genetics**, v. 190, p. 841-854, 2012.

PRETEL, E.; CAMPOREALE, G.; PRAT-GAY, G. The non-structural NS1 protein unique to respiratory syncytial virus: a two-state folding monomer in quasi-equilibrium with a stable spherical oligomer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, e74338, 2013.

RADHAKRISHNAN, A. et al. Protein analysis of purified respiratory syncytial virus particles reveals an important role for heat shock protein 90 in virus particle assembly. **Mol Cell Proteomics**, v. 9, n. 9,1829-48, 2010.

RINCHEVAL, V. et al. Functional organization of cytoplasmic inclusion bodies in cells infected by respiratory syncytial virus. **Nature Communications**, v. 8, n. 563, DOI: 10.1038/s41467-017-00655-9, 2017.

RODRÍGUEZ, L.; CUESTA, I.; ASENJO, A.; VILLANUEVA, N. Human respiratory syncytial virus matrix protein is an RNA-binding protein: binding properties, location and identity of the RNA contact residues. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 709-719, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2. ed. **New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

SCHERER, W. F.; SYVERTON, J. T.; GEY, G. O. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant ephitelial cells

(strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 97, p. 695-710, 1953.

SEO, J.; LEE, K-J. Post-translational Modifications and Their Biological Functions: Proteomic Analysis and Systematic Approaches**. Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n.1, p. 35-44, 2004.

SHAPIRO, A. B. et al. Quantitative Investigation of the Affinity of the Human Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein C-terminus Binding to Nucleocapsid Protein.**Virology Journal**. V. 19, p. 01-12, 2014.

SIMABUCO, F. M. **Expressão das proteínas N e P do Vírus Respiratório Sincicial Humano: estudos funcionais e de imunização**. 2008. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SIMABUCO, F. M. Gene Optimization Leads to Robust Expression of Human Respiratory Syncytial Virus Nucleoprotein and Phosphoprotein in Human cells and Induction of Humoral Immunity in Mice. **Journal of Virological Methods**, v. 158, p. 93–99, 2009.

SMITH, R. W. P.; BLEE, T. K. P.; GRAY, N. K. Poly(A)-binding Proteins are Required for Diverse Biological Processes in Metazoans. **Biochemical Society Transactions**, 42, (4), 1229-1237, 2014.

SMITH, R. W. P.; GRAY, N. K. Poly(A)-binding protein (PABP): a common viral target. **Biochemical J**, v. 426, p. 1-11, 2010.

SNYDER, E. et al. Compound Heterozygosity for Y Box Proteins Causes Sterility Due to Loss of Translational Repression. **PLoS Genetics**, v. 11, n.12, e1005690. doi:10.1371/journal.pgen.1005690, 2015.

STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Slective High-level Expression of Cloned Genes. **Journal of Molecular Biology**, v. 189, p. 113-130, 1986.

SULLENDER, W. M. Respiratory syncytial virus genetic and antigenetic diversity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 1-15, 2000.

TAMURA, R. E. Tese: **Estudo dos domínios Funcionais da proteína de matriz do Vírus Respiratório Sincicial Humano**, 2009.

TAKARA. ***E.coli* HST08 Premium Competent Cells Product Manual-2018**. Kusatsu, p. 1-4, 2018.

TANG, R. S.; NGUYEN, N.; CHENG, X.; JIN, H. Requirement of Cysteines and Length of the Human Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein for Protein Function and Virus Viability. **Journal of Virology**, v. 75, p 11328-11335, 2001.

TANNER, S. J. et al. Crystal structure of the essential transcription antiterminator M2-1 protein of human respiratory syncytial virus and implications of its phosphorylation. **PNAS**, v. 11, n. 4, p. 1580-1585, 2014.

TAWAR, R. G. et al. Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of

respiratory syncytial virus. **Science**, v. 326, p. 1279–1283, 2009.

TERNETTE, N. et al. Expression of RNA virus proteins by RNA polymerase II dependent expression plasmids is hindered at multiple steps. **Virol J**, v. 4, n. 51, p. 1-10, 2007.

TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 60, n. 5, 523-533, 2003.

THOMAS, W. G. **Proceedings Of The Australian Phisiological Society**, 39, 126P.http://aups.org.au/Proceedings/39/126P/, 2008.

ZHANG, P. et al. Characterization of Recombinant Influenza A Virus as a Vector Expressing Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Epitopes. **Journal of General Virology**, v. 95, p. 1886-1891, 2014.