UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E BIOAGENTES
PATOGENICOS

LUCAS ALVES TAVARES

O Envolvimento da Proteína Adaptadora 1 (AP-1) no
Mecanismo de Regulação Negativa do Receptor CD4 por
Nef de HIV-1

RIBEIRÃO PRETO

2016

LUCAS ALVES TAVARES

O Envolvimento da Proteína Adaptadora 1 (AP-1) no Mecanismo de Regulação Negativa do Receptor CD4 por Nef de HIV-1

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do Título de
Mestre em Ciências – Área de
Concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Luis Lamberti Pinto da Silva

RIBEIRÃO PRETO

2016

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

Tavares, Lucas Alves

O Envolvimento da Proteína Adaptadora 1 (AP-1) no Mecanismo de Regulação Negativa do Receptor CD4 por Nef de HIV-1. Ribeirão Preto, 2016.

48 p.: il. ; 30 cm

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

Orientador: da Silva, Luis Lamberti Pinto

1. AP-1. 2. γ 1-adaptina 3. γ 2-adaptina. 4. Nef. 5. HIV-1. 6. regulação negativa de CD4. 7. ESCRT. 8. MVB.

TAVARES, L. T. O Envolvimento da Proteína Adaptadora 1 (AP-1) no Mecanismo de Regulação Negativa do Receptor CD4 por Nef de HIV-1. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de mestre em Biologia Celular e Molecular.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

“Não importa quão estreito o portão, quão
repleta de castigo a sentença. Eu sou o
senhor do meu destino, eu sou o capitão
da minha alma”.

William Ernest Henley

Agradecimentos

Eu agradeço primeiro a Deus por todas as oportunidades que ele me deu ao longo da minha vida que me fizeram chegar até aqui. Agradeço também aos meus pais, Fernando e Ana Izaura, e aos meus irmãos, Igor e Vinícius, pelo apoio financeiro e emocional, principalmente nos momentos que eu mais precisava. Agradeço também a minha namorada Lummy pelo companheirismo e pelo apoio ao longo desta caminhada. Gostaria de agradecer aos meus amigos de Belo Horizonte pelos momentos curtos e intensos que eu vivi com vocês quando eu voltava para casa, como se cada segundo fosse essencial e suficiente para continuar a minha jornada. Agradeço também aos meus professores, colegas e amigos do Rio Grande do Sul que me apoiaram em fazer a pós-graduação na USP. Agradeço também ao Professor Dr. Luis Lamberti, pela oportunidade de fazer o trabalho de mestrado em seu laboratório e a todos que fazem parte da sua equipe. Gostaria de agradecer à FAPESP, pela bolsa de mestrado (Nº de processo 2014/19713-0), à FMRP-USP e aos funcionários e estudantes da pós-graduação em biologia celular e molecular da FMRP-USP.

RESUMO

TAVARES, L. A. **O Envolvimento da Proteína Adaptadora 1 (AP-1) no Mecanismo de Regulação Negativa do Receptor CD4 por Nef de HIV-1.** 2016. 48f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). A AIDS é uma doença de distribuição mundial, e estima-se que existam atualmente pelo menos 36,9 milhões de pessoas infectadas com o vírus. Durante o seu ciclo replicativo, o HIV promove diversas alterações na fisiologia da célula hospedeira a fim de promover sua sobrevivência e potencializar a replicação. A rápida progressão da infecção pelo HIV-1 em humanos e em modelos animais está intimamente ligada à função da proteína acessória Nef. Dentre as diversas ações de Nef está a regulação negativa de proteínas importantes na resposta imunológica, como o receptor CD4. Sabe-se que esta ação resulta da indução da degradação de CD4 em lisossomos, mas os mecanismos moleculares envolvidos ainda são totalmente elucidados. Nef forma um complexo tripartite com a cauda citosólica de CD4 e a proteína adaptadora 2 (AP-2), em vesículas revestidas por clatrina nascentes, induzindo a internalização e degradação lisossomal de CD4. Pesquisas anteriores demonstraram que o direcionamento de CD4 aos lisossomos por Nef envolve a entrada do receptor na via dos corpos multivesiculares (MVBs), por um mecanismo atípico, pois, embora não necessite da ubiquitinação de carga, depende da ação de proteínas que compõem os ESCRTs (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) e da ação de Alix, uma proteína acessória da maquinaria ESCRT. Já foi reportado que Nef interage com subunidades dos complexos AP-1, AP-2, AP-3 e Nef não parece interagir com subunidades de AP-4 e AP-5. Entretanto, o papel da interação de Nef com AP-1 e AP-3 na regulação negativa de CD4 ainda não está totalmente elucidado. Ademais, AP-1, AP-2 e AP-3 são potencialmente heterogêneos devido à existência de isoformas múltiplas das subunidades codificadas por diferentes genes. Todavia, existem poucos estudos para demonstrar se as diferentes combinações de isoformas dos APs são formadas e se possuem propriedades funcionais distintas. O presente trabalho procurou identificar e caracterizar fatores celulares envolvidos na regulação do tráfego intracelular de proteínas no processo de regulação negativa de CD4 induzido por Nef. Mais especificamente, este estudo buscou caracterizar a participação do complexo AP-1 na modulação negativa de CD4 por Nef de HIV-1, através do estudo funcional das duas isoformas de γ -adaptina, subunidades de AP-1. Utilizando a técnica de Pull-down demonstramos que Nef é capaz de interagir com $\gamma 2$. Além disso, nossos dados de *Imunoblot* indicaram que a proteína $\gamma 2$ -adaptina, e não $\gamma 1$ -adaptina, é necessária no processo de degradação lisossomal de CD4 por Nef e que esta participação é conservada para degradação de CD4 por Nef de diferentes cepas virais. Ademais, por citometria de fluxo, o silenciamento de $\gamma 2$, e não de $\gamma 1$, compromete a diminuição dos níveis de CD4 por Nef da membrana plasmática. A análise por imunofluorescência indireta também revelou que a diminuição dos níveis de $\gamma 2$ impede a redistribuição de CD4 por Nef para regiões perinucleares, acarretando no acúmulo de CD4, retirados por Nef da membrana plasmática, em endossomos primários. A depleção de $\mu 1A$, outra subunidade de AP-1, acarretou na diminuição dos níveis celulares de $\gamma 2$ e $\gamma 1$, bem como, no comprometimento da eficiente degradação de CD4 por Nef. Além disso, foi possível observar que, ao perturbar a maquinaria ESCRT via super-expressão de HRS (uma subunidade do complexo ESCRT-0), ocorreu um acúmulo de $\gamma 2$ em endossomos dilatados contendo HRS-GFP, nos quais também detectou-se CD4 que foi internalizado por Nef. Em conjunto, os resultados indicam que $\gamma 2$ -adaptina é uma importante molécula para o direcionamento de CD4 por Nef para a via ESCRT/MVB, mostrando ser uma proteína relevante no sistema endo-lisossomal. Ademais, os resultados indicaram que as isoformas γ -adaptinas não só possuem funções distintas, mas também parecem compor complexos AP-1 com diferentes funções celulares, já que apenas a variante AP-1 contendo $\gamma 2$, mas não $\gamma 1$, participa da regulação negativa de CD4 por Nef. Estes estudos contribuem para o melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na atividade de Nef, que poderão também ajudar na melhor compreensão da patogênese do HIV e da síndrome relacionada. Em adição, este trabalho contribui para o entendimento de processos fundamentais da regulação do tráfego de proteínas transmembrana no sistema endo-lisossomal.

Palavras-chave: AP-1, $\gamma 1$, $\gamma 2$, Nef, HIV-1, regulação negativa de CD4, ESCRT, MVB

ABSTRACT

TAVARES, L. A. **The involvement of Adaptor Protein 1 (AP-1) on the Mechanism of CD4 Down-regulation by Nef from HIV-1.** 2016. 48f. Dissertation (Master's Degree). Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The Human Immunodeficiency Virus (HIV) is the etiologic agent of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). AIDS is a disease which has a global distribution, and it is estimated that there are currently at least 36.9 million people infected with the virus. During the replication cycle, HIV promotes several changes in the physiology of the host cell to promote their survival and enhance replication. The fast progression of HIV-1 in humans and animal models is closely linked to the function of an accessory protein Nef. Among several actions of Nef, one is the most important is the down-regulation of proteins from the immune response, such as the CD4 receptor. It is known that this action causes CD4 degradation in lysosome, but the molecular mechanisms are still incompletely understood. Nef forms a tripartite complex with the cytosolic tail of the CD4 and adapter protein 2 (AP-2) in clathrin-coated vesicles, inducing CD4 internalization and lysosome degradation. Previous research has demonstrated that CD4 target to lysosomes by Nef involves targeting of this receptor to multivesicular bodies (MVBs) pathway by an atypical mechanism because, although not need charging ubiquitination, depends on the proteins from ESCRTs (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) machinery and the action of Alix, an accessory protein ESCRT machinery. It has been reported that Nef interacts with subunits of AP-1, AP-2, AP-3 complexes and Nef does not appear to interact with AP-4 and AP-5 subunits. However, the role of Nef interaction with AP-1 or AP-3 in CD4 down-regulation is poorly understood. Furthermore, AP-1, AP-2 and AP-3 are potentially heterogeneous due to the existence of multiple subunits isoforms encoded by different genes. However, there are few studies to demonstrate if the different combinations of APs isoforms are form and if they have distinct functional properties. This study aim to identify and characterize cellular factors involved on CD4 down-modulation induced by Nef from HIV-1. More specifically, this study aimed to characterize the involvement of AP-1 complex in the down-regulation of CD4 by Nef HIV-1 through the functional study of the two isoforms of γ -adaptins, AP-1 subunits. By pull-down technique, we showed that Nef is able to interact with $\gamma 2$. In addition, our data from immunoblots indicated that $\gamma 2$ -adaptin, not $\gamma 1$ -adaptin, is required in Nef-mediated targeting of CD4 to lysosomes and the $\gamma 2$ participation in this process is conserved by Nef from different viral strains. Furthermore, by flow cytometry assay, $\gamma 2$ depletion, but not $\gamma 1$ depletion, compromises the reduction of surface CD4 levels induced by Nef. Immunofluorescence microscopy analysis also revealed that $\gamma 2$ depletion impairs the redistribution of CD4 by Nef to juxtanuclear region, resulting in CD4 accumulation in primary endosomes. Knockdown of $\mu 1A$, another subunit of AP-1, resulted in decreased cellular levels of $\gamma 1$ and $\gamma 2$ and, compromising the efficient CD4 degradation by Nef. Moreover, upon artificially stabilizing ESCRT-I in early endosomes, via overexpression of HRS, internalized CD4 accumulates in enlarged HRS-GFP positive endosomes, where co-localize with $\gamma 2$. Together, the results indicate that $\gamma 2$ -adaptin is a molecule that is essential for CD4 targeting by Nef to ESCRT/MVB pathway, being an important protein in the endo-lysosomal system. Furthermore, the results indicate that γ -adaptins isoforms not only have different functions, but also seem to compose AP-1 complex with distinct cell functions, and only the AP-1 variant comprising $\gamma 2$, but not $\gamma 1$, acts in the CD4 down-regulation induced by Nef. These studies contribute to a better understanding on the molecular mechanisms involved in Nef activities, which may also help to improve the understanding of the HIV pathogenesis and the related syndrome. In addition, this work contributes with the understanding of primordial process regulation on intracellular trafficking of transmembrane proteins.

Key-words: AP-1, $\gamma 1$, $\gamma 2$, Nef, HIV-1, CD4 down-regulation, ESCRT, MVB

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
SUMÁRIO	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABELAS	x
INTRODUÇÃO	1
1.1. O Vírus da Imunodeficiência Humana.....	2
1.2. Ciclo Replicativo do HIV-1	3
1.3. A proteína Nef – características gerais.....	6
1.4. A regulação negativa de CD4 por Nef de HIV-1	7
1.5. A maquinaria dos ESCRT na regulação negativa de CD4 por Nef de HIV-1.....	9
1.6. A participação das proteínas adaptadoras (APs) na regulação negativa de CD4 por Nef de HIV-1	10
OBJETIVOS.....	12
2.1.Objetivo Geral	13
2.2.Objetivos Específicos.....	13
MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1.Plasmídeos de Expressão	15
3.2.Linhagens Celulares.....	15
3.3.Imunofluorescência e Microscopia Confocal	15
3.4.Silenciamento de γ 1-adaptina, γ 2-adaptina e μ 1A-adaptina em células HeLa CCL2.....	16
3.5.SDS-PAGE e Eletrotransferência.....	17
3.6.Imunodeteção em membrana de nitrocelulose.....	17
3.7.Citometria de Fluxo	17
3.8.Anticorpos	18
3.9.Técnicas de biologia molecular	19
3.10.Ensaio de Pull-down	20
3.11.Análise Estatística.....	20
RESULTADOS	21
4.1. Nef interage fisicamente com γ 2-adaptina	22
4.2. γ 2-adaptina, mas não γ 1-adaptina, é necessária para degradação lisossomal de CD4 por Nef.....	23
4.3.Depleção de γ 2-adaptina, mas não de γ 1-adaptina, compromete a diminuição níveis de CD4 por Nef da membrana plasmática	25

4.4. Depleção de γ 2-adaptina impede a redistribuição de CD4 para a região perinuclear por Nef, levando a retenção de CD4 em endossomos primários.....	26
4.5. γ 2-adaptina é parte de uma variante do complexo AP-1 envolvido na degradação lisossomal de CD4 por Nef	28
4.6. γ 2-adaptina é recrutada para membranas de compartimentos endossomais.....	30
4.7. O bloqueio da via ESCRT/MVB promove a co-localização de γ 2 e CD4 em endossomos dilatados em células expressando Nef.....	32
DISCUSSÃO	34
CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do ciclo celular do HIV-1	5
Figura 2. Representação esquemática dos mecanismos para a regulação negativa de CD4 induzida por Nef	9
Figura 3. Desenho esquemático das subunidades dos complexos APs	11
Figura 4. Nef interage $\gamma 2$	23
Figura 5. $\gamma 2$ -adaptina, mas não $\gamma 1$ -adaptina, é necessária para a degradação lisossomal de CD4 por Nef.....	24
Figura 6. Depleção de $\gamma 2$ -adaptina inibe a degradação lisossomal de CD4 induzida por Nef de diferentes cepas viras.....	25
Figura 7. Depleção de $\gamma 2$ -adaptina, mas não de $\gamma 1$ -adaptina, compromete a diminuição níveis de CD4 por Nef da membrana plasmática	26
Figura 8. Depleção de $\gamma 2$ -adaptina impede a redistribuição de CD4 para a região perinuclear por Nef.	27
Figura 9. Depleção de $\gamma 2$ leva ao acúmulo de CD4 em endossomos primários em células expressando Nef	28
Figura 10. Depleção de $\mu 1A$ compromete a degradação de CD4 induzida por Nef.....	29
Figura 11. $\gamma 2$ -adaptina co-localiza parcialmente com marcadores proteicos de endossomos iniciais e de reciclagem.....	31
Figura 12. HRS-GFP co-localiza com CD4 e $\gamma 2$ em células expressando Nef	33
Figura 13. AP-1, contendo a subunidade $\gamma 2$, participa do direcionamento de CD4, mediada por Nef, para a via ESCRT/MVB	39

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Análise quantitativa da co-localização de $\gamma 2$ e demais marcadores celulares	32
--	----

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. O Vírus da Imunodeficiência Humana

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) pertence à família dos Retrovírus, gênero Lentivírus, e é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Coffin *et al.*, 1986). Estima-se que em 2015 haviam 36,9 milhões de pessoas infectadas com o vírus no mundo, com 2 milhões de novos casos e 1,2 milhões de mortes relacionadas à síndrome no mesmo ano (Unaid, 2015). A grande população viral em um indivíduo infectado é geralmente originada de uma única célula infectada T CD4⁺ na mucosa tecidual localizada próxima ao local de exposição. Para uma grande parte do curso da infecção, a evolução viral é, aparentemente, um resultado da evasão das respostas imunes humoral e celular, enquanto que o vírus continua de se replicar em células T CD4⁺ utilizando CD4 como receptor e CCR5 ou CXCR4 como co-receptores (Berger *et al.* 1999). Neste contexto, a terapia antirretroviral aumentou drasticamente a expectativa e a qualidade de vida de portadores do vírus (Palella *et al.*, 1998), mas em consequência da grande frequência de mutações, o HIV pode desenvolver resistência a quase todas as drogas disponíveis (Jacqueline e Robert, 2002).

O HIV-1 é responsável pela pandemia global da AIDS e é o mais estudado. Em comparação com o HIV-1, o HIV-2 apresenta baixa capacidade de transmissão vertical e sexual em humanos e está majoritariamente localizada no Oeste da África, mas já se espalhou para outras partes da África, Europa, Índia e Estados Unidos (Jacqueline e Robert, 2002). Há evidências de que o HIV-1 e o HIV-2 foram introduzidos na população humana por transmissão zoonótica durante a primeira metade do século 20 e são, portanto, patógenos humanos recentes (Hahn *et al.*, 2000). Diversas espécies de primatas não humanos são naturalmente infectadas com lentivírus relacionados, mas geralmente não desenvolvem a síndrome (Schindler *et al.*, 2003), embora já se tenha relatos de HIV-1 modificado podendo vir a causar doença semelhante a AIDS em macacos (Hatzioannou *et al.*, 2014).

A progressão da síndrome acarretada pela infecção de HIV é resultante de alta carga viral plasmática, da diminuição dos níveis de CD4 e de doenças oportunistas infecciosas. Na fase aguda da síndrome, o vírus destrói células T CD4⁺ e, na fase crônica, o sistema imune gradativamente perde a sua capacidade de resposta. A hiper-

ativação das células infectadas favorece a produção do vírus, mas um brusco *turnover* de células T-CD4⁺ leva a ativação de morte celular, o que suporta a hipótese de que a destruição de células T CD4⁺ resulta em perda da regulação e da função do sistema imune, acarretando, em última instância, na imunodeficiência (Gottlieb, 1998; Meyaard *et al.*, 1994). A maioria dos indivíduos infectados com HIV-1, que não recebam tratamento, desenvolvem AIDS em até 6 a 8 anos (Ho, 1995).

O genoma de RNA do HIV-1 possui 9.2 kb, com nove ORFs (*Open Reading Frames*) e flanqueado por LTRs (*Long Terminal Repeats*), que funcionam como promotores. Da região 5' a 3' do genoma são encontrados os genes *gag* (*Group-specific antigen*), *pol* (*polimerase*) e *env* (*Envelope polyprotein*). O gene *gag* codifica uma proteína precursora chamada Pr55Gag, que é clivada pela protease viral (PR) gerando as proteínas estruturais: matriz (MA ou p17), capsídeo (CA ou p24), nucleocapsídeo (NC ou p7) e a p6. Já *pol* codifica uma proteína precursora (Pr160 GapPol), que é clivada gerando moléculas essenciais para a replicação: a protease (PR), a transcriptase reversa (RT) e a integrase (IN); Env também é sintetizada como uma molécula precursora, que é processada, gerando as glicoproteínas estruturais gp120 e gp41 (Frankel e Young, 1998). Além das proteínas já citadas, HIV-1 codifica outras proteínas regulatórias e acessórias, que contribuem para a modificação de fatores celulares e fatores do sistema imune do hospedeiro, assegurando a eficácia da infecção, da replicação e da disseminação *in vivo*, bem como, da replicação viral *in vitro* (Malim e Emerman, 2008). São elas: Tat (*HIV-1-trans-activating* ou p14), crítica para a transcrição das extremidades 5' e 3' do HIV; Rev (*Regulator of expression of virion proteins* ou p19), promove a exportação nuclear de mRNAs virais com *splicing* incompleto; Vpu (*Viral protein U*), influencia na liberação de partículas virais; Vif (*Viral infectivity factor*), essencial para replicação viral, principalmente pela sua habilidade de interagir com APOBEC3G, um componente do sistema imune inato, e direcioná-lo para degradação, Vpr (*Viral protein R*), detém a célula em G2 no ciclo celular e a proteína multifuncional Nef (*negative fator*) (Greene e Peterlin, 2002).

1.2. Ciclo Replicativo do HIV-1

O vírus HIV-1 entra na célula utilizando a glicoproteína externa gp120 que se liga ao receptor da célula hospedeira CD4. Após esta ligação, são iniciadas mudanças conformacionais no envelope viral, permitindo a exposição do sítio de ligação para receptores de quimiocina (Wyatt & Sodroski, 1998). Os receptores de quimiocina utilizados pelo HIV-1 como co-receptores são principalmente CCR5 e CXCR4 (Berger *et al.*, 1999). O HIV-1 é classificado de acordo com os co-receptores utilizados: CCR5 são utilizados pelas cepas R5 (*non-syncytium-inducing*) e CXCR4 são utilizados pelas cepas X4 (*syncytium-inducing*). Linhagens de células T normalmente expressam CXCR4, mas não expressam CCR5; linfócitos primários expressam ambos e macrófagos expressam apenas CCR5. Já o HIV-2 e SIV são capazes de utilizar um amplo espectro de co-receptores (Berger *et al.*, 1999).

A interação do complexo gp120-CD4 com o receptor quimiocina apropriado ativa uma nova mudança conformacional no envelope glicoproteico e resulta na inserção da região hidrofóbica N-terminal de gp41 na membrana da célula alvo; posteriormente, a fusão entre o vírus e a célula acontece (Freed, 2015). Miyachi e colaboradores em 2009 confirmaram este processo de fusão entre o vírus e a célula, demonstrando ainda que o HIV-1 utiliza a maquinaria endocítica para entrar na célula alvo (Miyachi *et al.*, 2009).

Depois da entrada viral na célula, o RNA genômico do vírus é transcrito reversamente em DNA pela RT e se integra no genoma da célula pela IN. O vírus pode permanecer latente neste estado (se integrado ao genoma) por um longo período, antes de ele ser transcrito, replicado, formado e liberado da membrana celular (Freed, 1998, 2015).

O pró-vírus integrado contém sequências flanqueadoras nomeadas LTRs nas extremidades 5' e 3', contendo as sequências promotoras que permitem a transcrição em RNA. Uma vez integrado, a transcrição ativa do pró-vírus é regulada por duas proteínas virais, Tat e Rev, bem como outros fatores da célula hospedeira (Frankel & Young, 1998). Inicialmente no ciclo replicativo, novos transcritos de mRNA sofrem *splicing* em múltiplas regiões e Tat, Vpr e Nef são produzidos (Schwarz *et al.*, 2003). Uma vez que ocorre o acúmulo destas proteínas regulatórias, pode ser efetuada a síntese de mRNAs viral que sofreu um único *splicing* e de outras que não sofreram *splicing*. Tradução de Gag e Pol acontece em ribossomos livres no citosol no, enquanto Env é translocado na

membrana do retículo endoplasmático durante a tradução. Em seguida, Env é transportado para o complexo de Golgi, onde são realizadas glicosilações e o processamento de Env em gp120 e gp41. O mRNA viral que não sofreu *splicing* é traduzido em proteínas virais estruturais e enzimáticas. Finalmente, todos os componentes virais atingem a membrana plasmática; novos vírus são montados e liberados da membrana plasmática ao mesmo tempo em que estão adquirindo Env. Após o brotamento, Gag e Gag-pol são clivadas por PR, tornando o vírus maduro e infeccioso (Kaplan, 1994; Freed, 1998, 2015). O ciclo replicativo do HIV-1 se encontra resumido na Fig. 1.

O ciclo replicativo do HIV1 recém-descrito é comumente dividido em Fase Inicial e Fase Tardia (Freed, 1998, 2015). A Fase Inicial começa com a ligação de gp120 viral com CD4 da célula hospedeira e termina com a integração no genoma da célula. A Fase Tardia se inicia a partir da transcrição do pró-vírus e finaliza na liberação do vírus da célula e sua posterior maturação (Freed, 1998, 2015).

Figura 1. **Representação esquemática do ciclo celular do HIV-1.** A infecção começa quando a glicoproteína do envelope viral gp120 se liga ao receptor CD4 e ao co-receptor de quimiocina (1), o que leva a fusão da membrana da célula viral e entrada da partícula do vírus na célula (2). O core viral sofre descapsulamento (3), facilitando a transcrição reversa (4), que por sua vez produz o complexo de pré-integração (PIC). Após importação para o núcleo da célula (5), PIC associado com IN orquestra a formação do pró-vírus que será integrado no genoma da célula hospedeira (6). A transcrição viral (7) resulta em diferentes tamanhos de mRNAs virais, cujo os de maior tamanho requerem exportação dependentes de energia para deixar o núcleo (8). mRNAs genômico servem de molde para a tradução

proteica (9) ou para a montagem de partículas virais (10). O brotamento da partícula viral mediada por ESCRT e Alix (11) e consequente liberação (12) a partir da célula que é acompanhado posteriormente pela maturação mediada pelo PR (13) gerando a partícula viral infecciosa (Adaptado de Engelman & Cherepanov, 2012).

1.3. A proteína Nef – características gerais

O gene *nef* do HIV-1, de HIV-2 e do Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV) foi originalmente designado como 3' ORF e, posteriormente, designado como *Negative fator* (Nef) (Arya e Gallo, 1986), e é um dos genes mais estudados destes vírus. Em HIV e SIV, a região codificadora de *nef* se sobrepõe a região 3' do gene *env*, e se estende até a região U3 da 3' LTR (Ratner *et al.*, 1987). Nef de HIV-1, cepa NL4-3 (utilizado nesse estudo e designado apenas como Nef em diante), é codificado pelos nucleotídeos 8343 a 8963 do genoma viral, que corresponde a 207 aminoácidos. Em contraste, Nef do HIV-2 e Nef do SIV são proteínas de maior massa molecular, compreendendo 257 e 263 aminoácidos, respectivamente (Ratner *et al.*, 1987).

Estudos demonstram que Nef de HIV-1, cepa NL4-3, sofre pelo menos dois tipos de modificações pós-traducionais. A primeira é a miristoilação, em que um ácido graxo saturado de 14 carbonos (miristato) é covalentemente ligado à região N-terminal da proteína. O sinal de miristoilação está localizado entre os aminoácidos 1 e 6 e é encontrado totalmente conservado em todos os alelos de Nef de diferentes subtipos virais da doença, independente do estágio da doença em que o paciente se encontra (Shugars *et al.*, 1993). A associação de Nef às membranas celulares depende da miristoilação, sendo a associação às membranas necessária para a maioria das atividades já descritas para Nef. A segunda modificação pós-traducional é a fosforilação por serina-treonina quinases, no aminoácido serina, na posição 9 (Li *et al.*, 2005).

Nef contribui para a patogênese do HIV por meio de vários mecanismos. Nef modula positivamente a expressão de algumas moléculas da membrana plasmática, como CD95, I-CAM1, FasL e DC-SIGN (Münch *et al.*, 2007; Foster e Garcia *et al.*, 2008). Além disso, esta proteína auxilia o vírus a evadir o sistema imune, modulando negativamente a expressão de certas proteínas na superfície celular, como CD4, CD28, moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) e de classe II (MHC-II), críticos para a comunicação do sistema imune, aumentando a infectividade e a replicação viral (Münch *et al.*, 2007; Foster e Garcia *et al.*, 2008). Em células apresentadoras de antígeno como macrófagos e células dendríticas, a diminuição

dos níveis de MHC-I e de MHC-II na superfície celular assegura uma baixa apresentação de antígenos do vírus para as células T citotóxicas e células T *Helper*. Assim, o efeito global dessa estratégia é a redução da produção de anticorpos e da resposta específica contra o vírus, acarretando na diminuição do combate à infecção (Kirchhoff, 2008).

Recentemente, foi relatado duas novas moléculas reguladas negativamente por Nef: SERINC3 e SERINC5 (Rosa *et al.*, 2015; Usami *et al.*, 2015). Nestes estudos, os autores demonstraram que Nef impede que estas duas moléculas sejam incorporadas na partícula viral nascente. Desta forma, o vírus resultante é capaz de fundir-se corretamente com outra célula alvo e, conseqüentemente, entregar o core viral para o citoplasma da célula hospedeira. Entretanto, em vírus deficientes de Nef, estas moléculas são incorporadas ao vírus e este vírus é incapaz de se fundir a células alvo de forma eficiente. Portanto, os autores propõem que, na ausência de Nef, SERINC3 e SERINC5 são incorporados efetivamente nas partículas virais nascentes, impedindo a fusão deste vírus com a próxima célula alvo, através da inibição da expansão do poro formado entre o vírus e a membrana plasmática (Rosa *et al.*, 2015; Usami *et al.*, 2015).

1.4. A regulação negativa de CD4 por Nef de HIV-1

No início da epidemia de AIDS, observou-se que a infecção pelo vírus HIV acarreta na depleção dos linfócitos T CD4⁺ no sangue periférico de indivíduos infectados. No meio da década de 1980, foi estabelecido que a molécula de CD4 é o receptor de superfície celular para SIV / HIV, tornando-se o primeiro receptor retroviral identificado (Bour *et al.*, 1995).

CD4 é uma glicoproteína transmembrana de tipo I que, em células T, funciona como co-receptor, concomitante com o receptor de antígeno de célula T (TCR), para o reconhecimento de peptídeos antigênicos ligados a moléculas de MHC-II em células apresentadoras de antígenos (APCs). Neste contexto, CD4 estabiliza as interações entre as células T e as APCs, desencadeando transduções de sinais que irão ativar respostas imunes mediadas por células T (Swain, 1983).

Um dos efeitos mais proeminentes de Nef é a regulação negativa de CD4, uma glicoproteína expressa na superfície celular de linfócitos T *Helper* e de linhagens celulares de monócitos e macrófagos. CD4 também interage com Env de HIV-1, de HIV-2 e de SIV, servindo como o principal receptor para a entrada do vírus nas células alvo (Bowers, *et al.*, 1997). Diversas linhas de estudo sugerem que a diminuição dos níveis de CD4 na membrana plasmática de células infectadas seja vantajosa para a replicação e a disseminação do vírus no hospedeiro (Foster & Garcia, 2008). Estes benefícios seriam: 1) evitar ciclos repetidos de invasão celular (superinfecção), o que poderia causar morte prematura da célula (Wildum *et al.*, 2006) e 2) facilitar a produção e brotamento de novas partículas virais, minimizando interações improdutivas entre CD4 e proteínas do envelope viral (Lama *et al.*, 1999; Ross *et al.*, 1999).

Nef diminui a expressão de CD4 na superfície celular pela aceleração da endocitose e posterior direcionamento deste receptor para a degradação nos lisossomos (Rhee & Marsh, 1994), diferentemente de outros receptores endocíticos, como o receptor de transferrina ou o receptor de LDL, que retornam à membrana plasmática após serem endocitados. Nef se liga a cauda citosólica de CD4 e recruta fatores celulares para transportar o CD4 da membrana plasmática para a degradação lisossomal (Fig. 2).

Figura 2. **Representação esquemática dos mecanismos para a regulação negativa de CD4 induzida por Nef.** Nef forma um complexo tripartite com AP-2 e com a cauda citosólica de CD4 em vesículas revestidas de clatrina, internalizando o receptor e direcionando-o para a degradação lisossomal. A participação de TSG101/ESCRT-I e Alix neste processo foi recentemente relatada (daSilva et al., 2009; Amorim et al., 2014), mas como Nef retém CD4 em endossomos e incorpora o receptor em ILVs nascentes em MVBs para posterior degradação em lisossomos ainda não está totalmente claro.

1.5. A maquinaria dos ESCRT na regulação negativa de CD4 por Nef de HIV-1

A regulação negativa da maioria dos receptores transmembrana da superfície celular envolve conjugação de ubiquitina a essas proteínas e seu direcionamento para o lúmen dos lisossomos para a degradação. A seleção em endossomos dos receptores para a degradação lisossomal ocorre por meio da interação dos complexos ESCRT (*Endosomal-Sorting Complex Required for Transport*). A maquinaria ESCRT compreende quatro complexos multiméricos distintos (ESCRT-0 a III) que funcionam sequencialmente para coordenar a seleção de receptores ubiquitinados com a formação de vesículas intraluminais (ILVs) de endossomos tardios, também conhecidos como corpos multivesiculares (MVBs) (Hurley e Hanson, 2010). A seleção dos receptores ubiquitinados se inicia nos subdomínios dos endossomos primários enriquecidos com um dos componentes do complexo ESCRT-0, o HRS (*hepatocyte grown fator-regulated tyrosine kinase substrate*), e com clatrina (Raiborg et al., 2002). HRS interage diretamente com a carga ubiquitinada e com ESCRT-I, que também se liga à ubiquitina e à ESCRT-II. Em seguida, o complexo ESCRT-III é recrutado, se agregando na membrana endossomal, facilitando a invaginação da membrana limitante de endossomos e a fissão dos ILVs. Vps4, uma AAA-ATPase, desagrega e recicla ESCRT-III nos MVBs e este processo é essencial para o funcionamento da maquinaria ESCRT. Dessa forma, pode-se resumir o funcionamento da maquinaria ESCRT em três processos distintos, mas interligados: primeiro, reconhecem cargas ubiquitinadas e impedem sua reciclagem de volta à membrana plasmática; segundo, deformam a membrana endossomal; terceiro, catalisam a fissão de invaginações no endossomo, formando ILVs (Raiborg e Stenmark, 2009).

Diferentemente de outros receptores que reciclam de volta a membrana plasmática, as moléculas de CD4 que são internalizados por Nef de HIV-1, não retornam para a superfície celular e, ao invés disso, são direcionados aos lisossomos para serem degradadas (Rhee e Marsh, 1994; Grzesiek et al., 1996). Esta via é

semelhante à via de degradação de receptores de sinalização, transportadores e outras proteínas transmembranas que são ubiquitinadas e incorporadas em ILVs nascentes em MVBs para posterior degradação em lisossomos (Raiborg e Stenmark, 2009). Contudo, o direcionamento de CD4 para ILVs induzidos por Nef independe de ubiquitinação (daSilva *et al.*, 2009). A seleção de proteínas-cargas em MVBs, de forma independente de ubiquitinação, mas dependente da maquinaria ESCRT, já é conhecida para alguns receptores (Hislop *et al.*, 2004; daSilva *et al.*, 2009; Henry *et al.*, 2011, Dores *et al.*, 2012a, 2012b).

1.6. A participação das proteínas adaptadoras (APs) na regulação negativa de CD4 por Nef de HIV-1

As proteínas adaptadoras (APs) são complexos heterotetraméricos que coordenam a concentração de carga vesicular em subdomínios de compartimentos doadores, com a formação de vesículas de transporte (Robinson, 2004, 2015). A especificidade do recrutamento baseia-se, em parte, na distribuição subcelular dos complexos APs. Dessa forma, AP-1 e AP-4 localizam-se no trans-Golgi, AP-2 na membrana plasmática, AP-3 nos endossomos primários e AP-5 em endossomos tardios, e estes complexos encaminham carga a partir destas localidades (Park e Guo, 2014; Robinson, 2004, 2015). AP-2 é necessário para a regulação negativa de CD4 por Nef (Chaudhuri *et al.*, 2007): Nef forma um complexo tripartite com AP-2 e com a cauda citosólica de CD4, acarretando na internalização de CD4 em vesículas revestidas por clatrina na membrana plasmática (Piguet *et al.*, 1998; Chaudhuri *et al.*, 2007; Gondim *et al.*, 2015; Ren *et al.*, 2014). Já AP-5 não interage com clatrina e sim com SPG11 (spastic paraplegia type 11) e SPG15 (*spastic paraplegia type 15*) (Hirst *et al.*, 2013); estas duas proteínas possuem estruturas preditas em α -solenóide semelhante a cadeia pesada de clatrina e às subunidades de COPI (*coatamer protein complex I*), tornando-as boas candidatas para servirem como proteínas de revestimento vesicular que requer AP-5 (Park & Guo, 2014). Sabe-se que AP-5 está envolvido na via endocítica tardia (Hirst *et al.*, 2011) e da seleção da carga (Hirst *et al.*, 2013), mas quais proteínas cargas participam deste processo ainda não foram reveladas.

Cada complexo contém duas subunidades grandes (γ e $\beta 1$ para AP-1, α e $\beta 2$ para AP-2, δ e $\beta 3$ para AP-3, ϵ e $\beta 4$ para AP-4, ζ e $\beta 5$ para AP-5), uma média ($\mu 1$ - $\mu 5$) e uma

pequena ($\sigma 1$ - $\sigma 5$) (Hirst *et al.*, 2011; Park & Guo, 2014; Robinson, 2004, 2015), conforme pode ser observado na Fig. 3.

Figura 3. **Desenho esquemático das subunidades dos complexos APs.** O esquema representa a estrutura geral em heterotetrâmero formado por quatro diferentes subunidades polipeptídicas. As subunidades com nomes comuns entre os APs são: β , μ e σ ; e a subunidade específica para cada adaptador é: γ , α , δ , ϵ e ζ , de AP-1 a AP- 5, respectivamente. No esquema é demonstrada também a região da dobradiça e orelha associada à subunidade grande dos APs (Adaptado de Bonifacino, J. S.; *Annual Report of the Division of Intramural Research*, 2014).

AP-1, AP-2 e AP-3 são potencialmente heterogêneos devido à existência de isoformas múltiplas das subunidades codificadas por diferentes genes, incluindo duas subunidades γ ($\gamma 1$ e $\gamma 2$), duas $\mu 1$ ($\mu 1A$ e $\mu 1B$) e três $\sigma 1$ ($\sigma 1A$, $\sigma 1B$ e $\sigma 1C$) para AP-1; duas α (αA e αC) para AP-2; e duas $\beta 3$ ($\beta 3A$ e $\beta 3B$), duas $\mu 3$ ($\mu 3A$ e $\mu 3B$) e duas $\sigma 3$ ($\sigma 3A$ e $\sigma 3B$) para AP-3 (Boehm & Bonifacino, 2001; Park & Guo, 2014; Robinson, 2004, 2015). A combinação de diferentes isoformas das subunidades pode, em teoria, gerar pelo menos doze complexos de AP-1, quatro de AP-2 e oito de AP-3. Entretanto, existem poucos estudos para demonstrar se estas diferentes combinações de isoformas dos APs são formadas e se possuem propriedades funcionais distintas.

Nef interage com subunidades de pelo menos três dos cinco complexos AP: AP-1, AP-2 e AP-3 (Janvier *et al.*, 2003; Chaudhuri *et al.*, 2007). Nef parece não interagir com AP-4 (Mattera *et al.*, 2011) e a interação com AP-5 ainda não foi relatada. Nef interage com os APs através dos motivos di-leucina conservados (D/EXXXL/I) presentes na proteína viral, que é reconhecido pelos hemicomplexos $\gamma 1$ - $\sigma 1$, α - $\sigma 2$ and δ - $\sigma 3$ dos respectivos APs (Chaudhuri *et al.*, 2007; Doray *et al.*, 2007; Janvier *et al.*, 2003). Entretanto, ainda não foi elucidada a participação da maioria destas isoformas na regulação negativa de CD4 por Nef de HIV-1.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Identificar e caracterizar fatores celulares envolvidos na regulação do tráfego intracelular de proteínas no processo de regulação negativa de CD4 por Nef de HIV-1.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Estudar o papel de AP-1 na regulação negativa de CD4 por Nef de HIV-1.

2.2.2. Estudar a diferença funcional das isoformas γ 1-adaptina e γ 2-adaptina, do complexo AP-1, no contexto da regulação negativa de CD4 por Nef de HIV-1.

MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

3.1. Plasmídeos de Expressão

O plasmídeo pCMV-CD4 codificando para CD4 humano foi provido por Klaus Strebel (NIAID, NIH). Já os vetores pCIneo e pIRES-GFP codificando para HIV-1 *wild-type* (WF) (alelos NL4-3, NA7 ou 248) e para Nef alelo SIVsmac239 foi descrito previamente por Chaudhuri *et al.*, 2007 e daSilva *et al.*, 2009, bem como os respectivos mutantes de di-leucina. O cDNA codificando para HRS foi amplificado de pCIneo3xHA-HRS (Amorim *et al.*, 2014) e clonado no vetor pEGFP C (Clontech, Mountain View, CA). A construção GST-Nef WT foi gerado em nosso laboratório, subclonando a sequência codificadora de Nef NL4-3 entre os sítios *EcoRI*/*SalI* no plasmídeo PGEX5.1 (GE Healthcare).

3.2. Linhagens Celulares

Células HeLa CCL2 (ATCC- Manassas, VA, EUA) foram crescidas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) da Invitrogen (Carisbad, CA, EUA). Os meios de cultura foram suplementados com: 10% v/v de soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen, Carisbad, CA, EUA), 3,7 g/L NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 100 U/mL penicilina e 100 g/mL estreptomicina (Gibco, Invitrogen, Carisbad, CA, EUA). As células foram cultivadas até confluência em placas ou garrafas de cultivo celular a 37 °C e 5% de CO₂. Ao atingirem 90% de confluência, elas foram removidas dos frascos de cultivo utilizando-se Tripsina-EDTA (Invitrogen, Gibco, Grand Island, NY, EUA) por 5 minutos a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após centrifugação a 100 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em meio de cultura para posterior quantificação e padronização do número de células.

3.3. Imunofluorescência e Microscopia Confocal

As células HeLa CCL2 foram aderidas em lamínulas de vidro, fixadas com 4% de paraformaldeído (PFA) em PBS durante 15 min à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram permeabilizadas com 0,01% de Saponina em PBS. As células foram incubadas com anticorpos primários e secundários em solução de bloqueio (0,2% de gelatina porcina mais 0,01% de Saponina em PBS). As lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro (Knittel Glase, Bielefeld, Alemanha). As células foram visualizadas por meio de microscópio confocal Zeiss LSM 780 disponível no Laboratório Multiusuário de Microscopia Multifoton (LMMM), pertencente ao departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP-USP onde este projeto foi desenvolvido.

3.4. Silenciamento de $\gamma 1$ -adaptina, $\gamma 2$ -adaptina e $\mu 1A$ -adaptina em células HeLa CCL2

Um protocolo com duração de seis dias foi utilizado para reduzir em células HeLa CCL2 os níveis endógenos dos componentes do complexo AP-1 (Lubben *et al.*, 2007). O tratamento com siRNA (*small interfering RNA*) foi realizado duas vezes, primeiramente no dia dois e depois no dia quatro do protocolo. A transfecção foi feita com Oligofectamina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e todos os siRNA foram adquiridos da Dharmacon RNA Technologies (Lafayette, CO). Em alguns ensaios, após a transfecção dos siRNAs, no dia cinco foram transfectados plasmídeos codificando pCMV-CD4, Nef mutante incapaz de modular negativamente CD4 (pCIneo-Nef L/A ou pIRES-GFP/Nef LL/AA) ou Nef *wild-type* (WT) (pCIneo-Nef WT ou pIRES-GFP/Nef LWT) e as amostras foram processadas para *immunoblot* ou para citometria de fluxo (ver a seguir).

Para a realização do *immunoblot*, as amostras foram lisadas com tampão de lise (Tris 50mM pH 7.5, NaCl 150 mM, 10% [v/v] glicerol, EDTA 5mM, 1% [v/v] Triton X-100) suplementado com coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich) e centrifugadas. O sobrenadante pós-nuclear foi coletado e a concentração de proteínas foi determinada e equalizada com o reagente BioRad Protein Assay pela medida da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro Evolution 60S (Thermo Scientific). Às amostras foram adicionados iguais volumes de tampão de amostras (4% SDS, 160 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 100 mM DTT e 0.005% de azul de bromofenol) em

ebulição. A eficiência do silenciamento foi analisada por *Western Blot* com anticorpos específicos.

3.5. SDS-PAGE e Eletrotransferência

Proteínas dos extratos celulares totais foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com corrente constante de aproximadamente 90 volts. O gel contendo os perfis proteicos foi equilibrado em tampão para transferência (25 mM Tris e 190 mM Glicina em Metanol 10%). O suporte para transferência foi colocado dentro de uma cuba de transferência, de modo que a membrana de nitrocelulose (Millipore, Bedford, MA) ficasse voltada para o polo positivo. A eletrotransferência foi realizada a 400 mA por 1 hora. A eficiência da transferência foi avaliada por coloração com solução de Ponceau (Ponceau S 0,1 % em ácido acético 5%).

3.6. Imunodeteccção em membrana de nitrocelulose

As membranas foram lavadas com PBS contendo Tween 20 a 0,1% (PBS-T) e incubadas em solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado e 1% de BSA em PBS-T) por 1 hora sob agitação. As membranas foram lavadas 3 vezes com PBS-T (intervalos de 5 minutos entre lavagens), incubadas com anticorpo primário *overnight* e lavadas novamente com PBS-T. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário adequado conjugado com HRP (*horseradish peroxidase*) por 45 min sob agitação e lavadas com PBS-T. Após a incubação, as membranas foram lavadas 5 vezes com PBS-T. Para detecção das proteínas utilizou-se solução de ECL com subsequente exposição das membranas e captação do sinal por luminômetro (Bio-Rad) acoplado ao sistema digital e software Image Lab (Bio-Rad).

3.7. Citometria de Fluxo

Mudanças nos níveis de CD4 na superfície celular foram avaliadas utilizando-se a técnica de citometria de fluxo. O CD4 da superfície celular foi marcado em células

vivas (não permeabilizadas) com anticorpos conjugados à marcadores fluorescentes. A fluorescência de GFP foi usada para selecionar células expressando Nef por meio do plasmídeo pIRES-GFP/Nef WT ou pIRES-GFP/Nef LL/AA. Os gráficos de barra representando os níveis de CD4 na superfície celular (média da intensidade da fluorescência dos histogramas) das células transfectadas com pIRES-GFP/Nef WT relativo as células transfectads com pIRES-GFP/Nef LL/AA (100%).

Para a citometria de fluxo, após o silenciamento e a co-transfecção de pCMV-CD4, pIRES-GFP/Nef WT ou pIRES-GFP/Nef LL/AA, as células foram retiradas da placa de cultura utilizando-se PBS suplementado com EDTA 2mM (USB Corportaion, Cleveland, OH, EUA), por 5 minutos a 37 °C. As células foram transferidas para microtubos, centrifugados por 5 minutos a 1000 x g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se anticorpo primário conjugado a APC diluído em PBA (PBS suplementado com 1% BSA) ao pellet. As amostras foram mantidas no escuro a 4 °C, por 1 hora. Finalizada a incubação das amostras, as mesmas foram lavadas e fixadas com formaldeído 1% diluído em PBA. A aquisição das amostras foi realizada utilizando o aparelho disponível no laboratório Multiusuário coordenado pelo Prof Dr. João Santada da Silva (Departamento de Imunologia – FMRP), o FACS Canto (BD Biosciences, San Jose, CA), e analisadas pelo *software* FlowJo (Fabricante).

3.8. Anticorpos

Os anticorpos utilizados para as técnicas de citometria de fluxo, *Western Blot* e imunofluorescência estão descritos abaixo, assim como seus respectivos fabricantes.

Citometria de Fluxo:

Anticorpo	Fabricante
CD4 conjugado-APC (S3.5)	Caltag (Burlingame, CA)

Western Blot:

Anticorpos	Fabricantes
μ1A-adaptina	BD Biosciences (San Jose, CA)
CD4 (H-370)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz,

	CA)
γ 1-adaptina	BD Biosciences (San Jose, CA)
γ 2-adaptina	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Nef	NIH AIDS Reagent Program
β -actina	Thermo Scientific (Rockford, IL)
Alix (N-20)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
anti-IgG de camundongo HRP	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
anti-IgG de coelho HRP	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
anti-IgG de carneiro HRP	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)

Imunofluorescência:

Anticorpos	Fabricantes
CD4	Caltag (Burlingame, CA)
γ 1-adaptina	BD Biosciences (San Jose, CA)
γ 2-adaptina	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
CD63	BD Biosciences (San Jose, CA)
EEA1 (clone 14/EEA1)	BD Biosciences (San Jose, CA)
TfR (clone H68.4)	Life Technologies
anti-IgG de camundongo Alexa 488	Life Technologies
anti-IgG de coelho Alexa 488	Life Technologies
anti-IgG de camundongo Alexa 594	Life Technologies
anti-IgG de coelho Alexa 594	Life Technologies
anti-IgG de cabra Alexa 594	Life Technologies

3.9. Técnicas de biologia molecular

Bactérias da cepa de *Escherichia coli* DH5 α (Woodcock *et al.*, 1989), gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Maria Helena S. Goldman (FFCLRP - USP - Ribeirão Preto, SP) foram utilizadas para multiplicar os plasmídeos. As bactérias foram

transformadas por choque térmico, nesta técnica o DNA plasmideal e a bactéria são incubados por 15 minutos no gelo, 3 minutos a 37°C e as células são cultivadas em meio LB (Luria Bertani) (Acumedia, Neogen Corporation, Lansing, MI, EUA), suplementado com o antibiótico apropriado, a 37°C. As preparações de DNA plasmideal para sequenciamento e transfecções foram realizadas utilizando o kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, EUA) ou PureYield Plasmid Maxipreps System (Promega, Madison, WI, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

3.10. Ensaio de Pull-down

Células HEK293 Peak expressando γ 2-GFP foram lisadas com tampão de lise (Tris 50mM pH 7.5, NaCl 150 mM, 10% [v/v] glicerol, EDTA 5mM, 1% [v/v] Triton X-100) suplementado com coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EUA). Estes homogenados foram incubados posteriormente com as *beads* de agarose (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Antes da incubação do lisado celular com as *beads*, as amostras contendo as proteínas GST e GST-Nef foram incubadas por 2 horas a 4°C com as *beads*. Posterior a esta incubação, as *beads* contendo GST ou GST-Nef imobilizadas foram lavadas e centrifugadas. Após a lavagem as *beads* foram incubadas por 2 horas a 4°C com o extrato celular. Seguindo a incubação, as *beads* foram lavadas e ressuspensas em tampão de amostra e incubadas 10 minutos a 90°C. As amostras então foram submetidas ao SDS-PAGE (10%) e, posteriormente, *immunoblot*.

3.11. Análise Estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo teste One Way Anova seguida de pós teste de múltipla comparação de Bofferroni, utilizando o *software* GraphPad Prism 5. O valor p de significância está representado por: * (p <0.05), ** (p <0.005) e *** (p <0.0005).

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. *Nef* interage fisicamente com $\gamma 2$ -adaptina

Estudos anteriores demonstraram pelo sistema de triplo híbrido em levedura que Nef é capaz de interagir com $\gamma 1$ - $\sigma 1$, $\gamma 2$ - $\sigma 1$, α - $\sigma 2$ e δ - $\sigma 3$ (Janvier *et al.*, 2003; Chaudhuri *et al.*, 2007; Mattera *et al.*, 2011). Entretanto, em contraste com as demais interações, a interação de Nef com $\gamma 2$ - $\sigma 1$ demonstrou-se fraca (Mattera *et al.*, 2011). Desta forma, objetivando confirmar a interação de Nef com $\gamma 2$, foi escolhido o ensaio de *Pull-down* de GST, por ser um ensaio amplamente utilizado para verificar interações entre proteínas *in vitro* (Phizicky & Fields, 1995; Rao *et al.*, 2014). Para tanto células HEK293 Peak foram transfectadas com plasmídeo codificando $\gamma 2$ -GFP e o extrato celular total foi usado nos ensaios de *Pull-down*. O resultado demonstra que $\gamma 2$ -GFP está presente no extrato celular total (Input) e que a proteína GST-Nef foi capaz de capturar a proteína $\gamma 2$ -GFP, conforme pode ser observado por *immunoblot* (Fig. 4). O mesmo não foi observado no controle, GST (Fig. 4). Logo, podemos concluir que Nef é capaz de interagir com $\gamma 2$ -adaptina *in vitro*, corroborando assim, com os resultados anteriores (Janvier *et al.*, 2003; Chaudhuri *et al.*, 2007; Mattera *et al.*, 2011).

Figura 4. **Nef interage $\gamma 2$** . A proteína Nef-GST e a proteína controle, GST, foram produzidas em *E. coli* e imobilizadas em esferas de agarose ligadas a glutationa. Após a imobilização, foi realizada a incubação das esferas com 10% do extrato celular de HEK293 Peak expressando $\gamma 2$ -GFP (Input). A ligação entre Nef e $\gamma 2$ -GFP foi revelada por *immunoblot* (IB) com anticorpos anti-GFP. A expressão de $\gamma 2$ -GFP, Nef fusionado a GST e do controle, GST sem fusão, foi verificada na membrana de netricelulose corada com Ponceau.

4.2. $\gamma 2$ -adaptina, mas não $\gamma 1$ -adaptina, é necessária para degradação lisossomal de CD4 por Nef

Resultados anteriores obtidos em nosso laboratório revelaram que a atividade da proteína $\gamma 2$ -adaptina, mas não a de $\gamma 1$ -adaptina, é requerida para o direcionamento eficiente de CD4 aos lisossomos induzido por Nef (Silva, 2014). A fim de compreender o mecanismo responsável por esse feito, foram inicialmente repetidos ensaios para avaliar comparativamente a função da interação de Nef com $\gamma 1$ ou $\gamma 2$. Assim, foi testado por RNAi se a depleção específica de $\gamma 1$ ou $\gamma 2$ -adaptina afetaria a degradação lisossomal de CD4 por Nef em células HeLa. Desta forma, a depleção mediada por siRNA (KD) de $\gamma 1$ ou $\gamma 2$ resultou na redução de aproximadamente 80% dos níveis de expressão destas proteínas (Fig. 5A). Além disso, siRNA para qualquer uma das γ -adaptinas não afetou os níveis da outra isoforma (Fig. 5A). A análise de *immunoblot* confirmou que a expressão de Nef diminuiu os níveis totais de CD4 (Fig. 5A, B), conforme já previamente reportado (daSilva *et al.*, 2009). Como controle negativo, utilizou-se um Nef mutante que teve substituição do aminoácido leucina por alanina no motivo ENTSSL¹⁶⁵. Este mutante não interage com $\gamma 1$ - $\sigma 1$, α - $\sigma 2$ ou δ - $\sigma 3$ (Chaudhuri *et al.*, 2007; Mattera *et al.*, 2011.) e não diminui os níveis totais de CD4 (daSilva *et al.*, 2009). A diminuição dos níveis de $\gamma 1$ não alterou a depleção de CD4 por Nef WT (Fig. 5A, B). Em contraste, a depleção de $\gamma 2$ impediu a redução dos níveis totais de CD4 por Nef (Fig. 2A, B). Em seguida, nos perguntamos se a participação de $\gamma 2$ na degradação de CD4 por Nef era algo exclusivo apenas da variante Nef NL4-3 (utilizada em todos os experimentos deste trabalho, exceto na Fig. 6), ou se de fato esta isoforma de γ -adaptina tem importância conservada para degradação lisossomal de CD4 por Nef de outras cepas virais. Conforme esperado, a degradação de CD4 induzida por outros dois alelos do HIV-1 Nef (variantes NA7 e 248) e o SIV Nef variante SIVmac293, anteriormente mostrado regular negativamente CD4 (Chaudhuri *et al.*, 2007), foi também fortemente inibida em células depletadas de $\gamma 2$ (Fig. 6). Em conjunto, estes resultados indicam que a proteína $\gamma 2$ -adaptina, e não $\gamma 1$ -adaptina, é necessária no processo de degradação

lisossomal de CD4 por Nef e que esta participação é conservada para degradação de CD4 por Nef de diferentes cepas virais.

Figura 5. $\gamma 2$ -adaptina, mas não $\gamma 1$ -adaptina, é necessária para a degradação lisossomal de CD4 por Nef. (A) Células Hela CCL2 foram transfectadas com siRNA controle ou siRNA para $\gamma 1$ e $\gamma 2$ duas vezes, com 48 horas de intervalo entre as transfecções. 24 horas após a segunda rodada de transfecção de siRNA, as células foram transfectadas com pCMV-CD4 junto com pCIneo-Nef L/A ou pCIneo-Nef WT, conforme indicado, e após 20 horas, quantidades equivalentes dos lisados celulares foram submetidas ao SDS-PAGE e ao *imunoblot*, utilizando anticorpos para CD4, HIV-1 Nef, $\gamma 1$, $\gamma 2$ e β -actina (controle de carregamento). As posições dos pesos moleculares estão indicados a esquerda em Kda. (*) Indica banda inespecífica reconhecida pelos anticorpos. (B) A intensidade do sinal para cada condição demonstrada no painel (A) foi determinada utilizando o Image Lab Software e expressas em porcentagem para o sinal de CD4 em células expressando Nef L/A (100%) para cada condição de siRNA. Os dados representam a média $\pm$ e o desvio padrão de cinco experimentos independentes. ***, $p < 0,005$; ns, não significativo..

Figura 6. **Depleção de $\gamma 2$ -adaptina inibe a degradação lisossomal de CD4 induzida por Nef de diferentes cepas virais.** Células HeLa CCL2 foram transfectadas com siRNA controle ou siRNA para $\gamma 2$, conforme em Fig. 5 e, em seguida transfectadas com pCMV-CD4 junto com pIRES-GFP, pIRES-GFP/HIV-1 Nef NA7, pIRES-GFP/HIV-1 Nef 248 ou pIRES-GFP/Nef SIVsmac293. Após 20 horas, quantidades equivalentes dos lisados celulares foram submetidas ao SDS-PAGE e ao *imunoblot*, utilizando anticorpos para CD4, HIV-1 Nef, $\gamma 2$, GFP. Note que o anticorpo HIV-1 Nef não foi capaz de reconhecer Nef de SIVsmac293. As posições dos pesos moleculares estão indicados a esquerda em Kda. (*) Indica banda inespecífica reconhecida pelos anticorpos e serve como controle de carregamento.

4.3. Depleção de $\gamma 2$ -adaptina, mas não de $\gamma 1$ -adaptina, compromete a diminuição níveis de CD4 por Nef da membrana plasmática

Em seguida, a fim de aprofundar o estudo da participação de $\gamma 1$ ou $\gamma 2$ na regulação negativa de CD4 por Nef, foi analisado os níveis de CD4 da membrana plasmática em células expressando Nef. A análise por citometria de fluxo demonstrou que os níveis da superfície celular de CD4 em células HeLa CCL2 expressando Nef WT foram reduzidos em 85,8% ($\pm 5.6\%$), quando comparado com células expressando Nef LL/AA (Fig. 7 A, B), corroborando com dados já previamente publicados (Amorim *et al.*, 2014; Chaudhuri *et al.*, 2007). Em contraste, a depleção de $\gamma 2$ acarretou na redução de 65,5% ($\pm 17,2\%$) dos níveis de CD4 na membrana plasmática (Fig. 7 A, B), indicando um comprometimento parcial da função de Nef. Conforme esperado, a depleção de $\gamma 1$ não compromete a redução dos níveis de CD4 na superfície celular em células expressando Nef WT (Fig. 7 A, B). Em conjunto, os resultados das Fig. 5-7 indicam que $\gamma 2$, mas não $\gamma 1$, é requerido para a regulação negativa de CD4 por Nef. Além disso, estes resultados indicam diferença funcional entre as duas isoformas no tráfego intracelular de proteínas.

Figura 7. **Depleção de $\gamma 2$ -adaptina, mas não de $\gamma 1$ -adaptina, compromete a diminuição níveis de CD4 por Nef da membrana plasmática.** (A) Células Hela CCL2 foram transfectadas com siRNA controle ou siRNA para $\gamma 1$ e $\gamma 2$ duas vezes, com 48 horas de intervalo entre as transfecções. 24 horas após a segunda rodada de transfecção de siRNA, as células foram transfectadas com pCMV-CD4 junto com pIRES-GFP/Nef LL/AA ou pIRES-GFP/Nef WT, conforme indicado. 20 horas após a transfecção, as células foram marcadas com anti-CD4 conjugado com o fluorocromo APC, fixadas e analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto II BD Biosciences. (B) Os gráficos de barras representam os níveis de CD4 (média da intensidade de fluorescência) na superfície de células expressando Nef em relação aos níveis dos respectivos controles (100%) (valores das médias do histograma de FACS). Os dados representam a média de seis repetições independentes ***, $p < 0,005$; ns, não significativo.

4.4. Depleção de $\gamma 2$ -adaptina impede a redistribuição de CD4 para a região perinuclear por Nef, levando a retenção de CD4 em endossomos primários

Em seguida, objetivando obter mais uma evidência que $\gamma 2$ é requerido para a regulação negativa de CD4 por Nef, foi analisado a participação desta proteína pela técnica de imunofluorescência indireta. A análise da microscopia confocal revelou que Nef redistribui drasticamente CD4 da membrana plasmática (Fig. 8 A-C) para a região perinuclear (Fig. 8 D-F). Embora a localização de $\gamma 2$ esteja mais dispersa pelo citoplasma, algumas das estruturas positivas para CD4 em células expressando Nef, também contém $\gamma 2$ (Fig. 8 D-F), demonstrando uma co-localização alta de aproximadamente 64% de CD4 com $\gamma 2$ (Tab. 1). Em contraste, a depleção de $\gamma 2$ acarreta na redistribuição de CD4 em células expressando Nef e CD4 passa a ser detectado em “*puncta*” dispersos pelo citoplasma (Fig. 8 J-L). Além disso, depleção de $\gamma 2$ em células expressando Nef leva ao aumento (de aproximadamente 27% para 70%; Tab. 1) da co-localização de CD4 com EEA1 (*Early Endosome Antigen 1*) - uma proteína periférica de endossomo primário recrutado para endossomo - indicando o acúmulo de CD4 em compartimentos pré-lisossomais (Fig. 9). Em conjunto, estes resultados corroboram com o fato de que a proteína $\gamma 2$ -adaptina é requerida para a eficiente regulação negativa de CD4 por Nef de HIV-1.

Figura 8. **Depleção de $\gamma 2$ -adaptina impede a redistribuição de CD4 para a região perinuclear por Nef.** Células Hela CCL2 foram transfectadas com siRNA controle (A-F) ou siRNA para $\gamma 2$ (G-L) duas vezes, com 48 horas de intervalo entre as transfecções. 24 horas após a segunda rodada de transfecção de siRNA, as células foram transfectadas com pCMV-CD4 junto com pCIneo ou pCIneo-Nef WT, conforme indicado. 20 horas após a transfecção, as células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo IgG monoclonal anti-CD4 (*mouse*) e anticorpo IgG policlonal anti- $\gamma 2$ (*rabbit*), seguido por marcação com anticorpos secundários anti-*mouse* ou anti-*rabbit* conjugados com Alexa-594 (canal vermelho) ou Alexa-488 (canal verde), respectivamente. Amarelo nas imagens de Sobreposição indica co-localização. As imagens foram capturadas no microscópio confocal Zeiss LSM 780, do Laboratório Multiusuário de Microscopia Multifotão (LMMM). Barra, 10 μ m. Os *insets* representam as áreas delimitadas com magnificação de x4.6.

Figura 9. **Depleção de $\gamma 2$ leva ao acúmulo de CD4 em endossomos primários em células expressando Nef.** Células Hela CCL2 foram transfectadas com siRNA controle (A-C) ou siRNA para $\gamma 2$ (D-F) duas vezes, com 48 horas de intervalo entre as transfecções. 24 horas após a segunda rodada de transfecção de siRNA, as células foram transfectadas com pCMV-CD4 junto com pCIneo-Nef WT, conforme indicado. 20 horas após a transfecção, as células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo IgG2a monoclonal anti-CD4 (*mouse*) e anticorpo IgG1 monoclonal anti-EEA1 (*mouse*), seguido por marcação com anticorpos secundários anti-*mouse* IgG2a ou anti-*mouse* IgG1 conjugados com Alexa-594 (canal vermelho) ou Alexa-488 (canal verde), respectivamente. Amarelo nas imagens de Sobreposição indica colocalização. As imagens foram capturadas no microscópio confocal Zeiss LSM 780, do Laboratório Multiusuário de Microscopia Multifotão (LMMM). Barra, 10 μ m.

4.5. $\gamma 2$ -adaptina é parte de uma variante do complexo AP-1 envolvido na degradação lisossomal de CD4 por Nef

A depleção de $\gamma 2$ acarretando no comprometimento da regulação negativa de CD4 por Nef nos levou a perguntar se $\gamma 2$ opera neste processo em sua forma monomérica ou como uma subunidade do complexo AP-1. Objetivando responder esta questão, foi realizada a depleção da subunidade $\mu 1A$, uma molécula pertencente ao complexo AP-1 e que interage fisicamente com as duas isoformas de γ -adaptina (Mattera *et al.*, 2011). A depleção de $\mu 1A$ levou a redução desta molécula em aproximadamente 85% (Fig. 10 A). Além disso, pode-se observar que a depleção de $\mu 1A$ levou à redução de 59% e 78% dos níveis de $\gamma 1$ e $\gamma 2$, respectivamente (Fig. 10 A). Este fato sugere que a depleção de $\mu 1A$ compromete a estabilidade das duas isoformas

de γ -adaptina e que provavelmente elas operam complexados com μ 1A e, portanto, como complexos AP-1. Em seguida, foi analisado os níveis totais de CD4 por *imunoblot* (Fig. 10 A, B) ou os níveis de CD4 na membrana plasmática (Fig. 10 C, D) em células depletadas para μ 1A. A depleção de μ 1A comprometeu a eficiente degradação lisossomal de CD4 por Nef (Fig. 10 A, B). Entretanto, o efeito inibitório não é tão forte quando comparado com a depleção de γ 2 (Fig. 5), talvez por causa de um efeito pleiotrópico resultante da indireta co-depleção de γ 1 (ver Discussão). Em contraste, a depleção de μ 1A acarretou em nenhum efeito na redução dos níveis de CD4 da membrana plasmática por Nef (Fig. 10 C, D). Portanto, estes resultados corroboram com a ideia de que γ 2 funcionalmente opera complexado com μ 1A (Mattera *et al.*, 2011) e que a expressão de μ 1A é necessária para a degradação eficiente de CD4 por Nef. Em conjunto, estes resultados indicam que uma variante de AP-1 que tem γ 2, e não com γ 1, como uma das subunidades, é requerida para a degradação lisossomal eficiente de CD4 por Nef de HIV-1.

Figura 10. **Depleção de μ 1A compromete a degradação de CD4 induzida por Nef.** Células Hela CCL2 foram transfectadas com siRNA controle ou siRNA para μ 1A duas vezes, com 48 horas de intervalo entre as transfecções. 24 horas após a segunda rodada de transfecção de siRNA, as células foram transfectadas com pCMV-CD4 junto com pCIneo-Nef L/A ou pCIneo-Nef WT, conforme indicado, e após 20 horas,

quantidades equivalentes dos lisados celulares foram submetidas ao SDS-PAGE e ao imunoblot, utilizando anticorpos para CD4, HIV-1 Nef, μ 1A, γ 1, γ 2 e β -actina (controle de carregamento). (B) A intensidade do sinal para cada condição demonstrada no painel (A) foi determinada utilizando o *Image Lab Software* e expressas em porcentagem para o sinal de CD4 em células expressando Nef L/A (100%) para cada condição de siRNA. (C) Células Hela CCL2 foram transfectadas com siRNA conforme em (A) e após a segunda rodada de transfecção de siRNA, as células foram transfectadas com pCMV-CD4 junto com pIRES-GFP/Nef LL/AA ou pIRES-GFP/Nef WT, conforme indicado. 20 horas após a transfecção, as células foram marcadas com anti-CD4 conjugado com o fluorocromo APC, fixadas e analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto II BD Biosciences. (D) Os gráficos de barras representam os níveis de CD4 (média da intensidade de fluorescência) na superfície de células expressando Nef em relação aos níveis dos respectivos controles (100%) (valores das médias do histograma de FACS). Os dados representam a média de quatro repetições independentes. **, $p < 0,05$, ***, $p < 0,005$; ns, não significativo.

4.6. γ 2-adaptina é recrutada para membranas de compartimentos endossomais

A fim de compreender melhor o papel de γ 2 na regulação negativa de CD4 por Nef, foi feito um estudo comparativo da distribuição de γ 2 com alguns marcadores celulares pela técnica de imunofluorescência indireta e, posteriormente, analisados por microscopia confocal. Através desta técnica, pode-se observar que estruturas positivas para γ 2 se encontram separadas das estruturas positivas para γ 1, embora uma fração pequena de γ 2 se co-localiza com γ 1 (~34%, Fig. 11 A-C, Tab. 1). Este padrão diferencial de distribuição sugere que γ 1 e γ 2 são recrutados para estruturas celulares distintas e, desta forma, podem participar de transporte de proteínas de diferentes locais. Além disso, demais co-localizações revelaram que γ 2 co-localiza com marcadores endossomais. Aproximadamente 26% de γ 2 co-localiza com EEA1 (Fig. 11 D-F, Tab. 1). Adicionalmente, uma grande proporção de γ 2 co-localiza com o receptor de transferrina (TfR) (~42%, Fig. 11 G-I, Tab. 1), uma proteína transmembrana que transita entre a membrana plasmática e o sistema endossomal, e, em estado de equilíbrio, se encontra localizado majoritariamente em endossomos iniciais e de reciclagem (Grant & Donaldson, 2009). Por fim, foi observado co-localização de aproximadamente 17% de γ 2 com CD63, uma proteína de endossomo tardio e lisossomo (Fig. 11 J-L, Tab. 1). Em conjunto, estes resultados indicam que γ 2-adaptina, além de ser recrutada para a região perinuclear, é também recrutada para membranas de compartimentos endossomais.

Figura 11. $\gamma 2$ -adaptina co-localiza parcialmente com marcadores proteicos de endossomos iniciais e de reciclagem. Células HeLa CCL2 foram cultivadas em lamínulas de vidro, fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo policlonal (*rabbit*) IgG anti- $\gamma 2$ e anticorpos monoclonais (*mouse*) IgG anti- $\gamma 1$ (A-C), anti-EEA1 (D-F), anti-TfR (G-I) e anti-CD63 (J-L) e incubados posteriormente com anticorpos secundários policlonais anti-*rabbit* IgG e monoclonais anti-*mouse* IgG fusionados com Alexa-488 (canal verde) e Alexa-594 (canal vermelho), respectivamente. Amarelo nas imagens de Sobreposição indica co-localização. As imagens foram capturadas no microscópio confocal Zeiss LSM 780, do Laboratório Multiusuário de Microscopia Multifotom (LMMM). Barra, 10 μ m.

	Coeficiente de Sobreposição de
--	--------------------------------

Proteínas	Mander	
	tM1	tM2
CD4 e EEA1 em células expressando Nef (siRNA controle)	0,27 ± 0,02 N=5	0,27 ± 0,04 N=5
CD4 e EEA1 em células expressando Nef (siRNA controle)	0,27 ± 0,02 N=5	0,27 ± 0,04 N=5
CD4 e EEA1 em células expressando Nef (siRNA γ 2-adaptina)	0,70 ± 0,02 N=5	0,64 ± 0,035 N=5
γ 2-adaptina e γ 1-adaptina	0.34 ±0.01; N=7	0.36 ±0.01; N=7
γ 2-adaptina e EEA1	0.26 ± 0.02; N=7	0.18 ±0.03; N=7
γ 2-adaptina e TfR	0.42 ± 0.04; N=5	0.51 ±0.03; N=5
γ 2-adaptina e CD63	0.17 ±0.02; N=7	0.35 ±0.02; N=7

Tabela 1. **Análise quantitativa da co-localização de γ 2 e demais marcadores celulares.** A quantificação de co-localização foi feita utilizando o *plugin threshold colocalization* do software *ImageJ* (Abràmoff *et al.*, 2004). Isto permite a determinação do coeficiente de co-localização de Mander tM1, definido como a intensidade total de *pixels* do cana 1 (verde) se sobrepõe ao canal 2 (vermelho), relativo ao total de intensidade do canal 1; e tM2, definido como a intensidade total de *pixels* do cana 2 (vermelho) se sobrepõe ao canal 1 (verde), relativo ao total de intensidade do canal 2. Estes coeficientes são calculados automaticamente por um valor determinado de *threshold*, para ambos os canais, de acordo com o algoritmo de Costes *et al.*, 2004, em que o valor de 1 representa colocalização total e 0 nenhuma co-localização. A tabela mostra a média ± SEM de tM1 e tM2 indicando a quantidade de sobreposição dos sinais das proteínas indicadas. Os dados de comparação foram obtidos de séries Z de fatias (intervalos de 0,3- μ m) de pelo menos cinco células.

4.7. O bloqueio da via ESCRT/MVB promove a co-localização de γ 2 e CD4 em endossomos dilatados em células expressando Nef

Conforme demonstrado em estudos anteriores, Nef reduz a expressão de CD4 na superfície celular, direcionando-os para MVBs e finalmente para a degradação em lisossomos (daSilva *et al.*, 2009; Chaudhuri *et al.*, 2007). O direcionamento de proteínas transmembrana para os MVBs envolve a atividade dos complexos ESCRT, (ESCRT-0, -I, -II, -III), e outros componentes associados os quais têm a função de direcionar cargas ubiquitinadas para o interior das ILVs dos MVBs para eventual degradação em lisossomos (Amorim *et al.*, 2014; Hurley & Hanson, 2010; Katzmann *et al.*, 2002). Foi demonstrado que Nef direciona CD4 internalizado para a via dos MVBs de uma maneira dependente da maquinaria ESCRT, mas independente de ubiquitinação (daSilva *et al.*, 2009).

Estudos anteriores demonstraram que γ 2 interage com componentes da maquinaria ESCRT e, desta forma, pode ter um papel no tráfego intracelular de proteínas, especificamente no sistema endo-lisossomal (Döring *et al.*, 2010). Portanto, uma vez que a degradação de CD4 por Nef é dependente da maquinaria ESCRT (daSilva *et al.*, 2009), é possível que γ 2 possa facilitar o direcionamento de CD4 para a

degradação lisossomal mediada por Nef na via ESCRT/MVB. Para confirmar esta hipótese, utilizamos estratégia de expressão de um dominante negativo, como a super-expressão de HRS (ESCRT-0). HRS é um componente-chave do complexo ESCRT-0, responsável pela concentração de carga e pelo recrutamento em cascata de outros complexos ESCRT fundamentais para a formação dos ILVs dos MVBs (Raiborg and Stenmark, 2009). A super-expressão de HRS perturba a via dos ESCRT, promovendo a acumulação de ESCRT-I em endossomos primários que se tornam dilatados (Bache *et al.*, 2003; Bishop *et al.*, 2002). Utilizando esta estratégia, foi possível observar, em células expressando HRS-GFP, $\gamma 2$ acumula-se em endossomos dilatados contendo HRS-GFP, onde também colocaliza com CD4 que foi internalizado por Nef (Fig. 12). Portanto, corroborando com resultados encontrados nas Fig. 7 e Fig. 9, a Fig. 12 indica que $\gamma 2$ -adaptina parece operar em compartimentos pré-lisossomais, participando do direcionamento de CD4 por Nef para a via ESCRT/MVB.

Figura 12. **HRS-GFP co-localiza com CD4 e $\gamma 2$ em células expressando Nef.** (A-H) Células HeLa CCL2 foram cultivadas em lamínulas de vidro e transfectadas com with pCMV-CD4 junto com pCIneo-Nef WT e pEGFP-HRS. 20 horas após a transfecção, as células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo monoclonal *mouse* IgG anti-CD4 e policlonal *rabbit* IgG anti- $\gamma 2$, seguido pela incubação com anticorpo monoclonal anti-*mouse* IgG e policlonal anti-*rabbit* IgG conjugados com Alexa-594 (canal vermelho) e Alexa-647 (canal verde), respectivamente. O GFP fluorescente de HRS-GFP é demonstrado no canal azul para facilitar a visualização. Em amarelo, ciano e branco representam colocalização nas imagens de Sobreposição. As imagens foram capturadas no microscópio confocal Zeiss LSM 780, do Laboratório Multiusuário de Microscopia Multifotom (LMMM). Barra, 10 μ m. Os *insets* representam as áreas delimitadas em uma magnificação de x5.

DISCUSSÃO

5. Discussão

Apesar da alta similaridade (60%) entre as sequências das duas isoformas de γ -adaptina, dados já reportados na literatura sugerem que $\gamma 1$ e $\gamma 2$ possam ter funções diferentes na célula e poderiam compor complexos adaptadores funcionalmente distintos (Lewin *et al.*, 1998; Mattera *et al.*, 2011; Takatsu *et al.*, 1998). Entretanto, não há nenhum estudo funcional comparativo entre as duas isoformas. Para testar esta diferença funcional, foi escolhida a estratégia de siRNA para silenciar especificamente uma das duas isoformas e avaliar os fenótipos no contexto da regulação negativa de CD4 por Nef de HIV-1. Nossos estudos revelaram que apenas $\gamma 2$ -adaptina, mas não $\gamma 1$ -adaptina, é necessária para a regulação negativa de CD4 por Nef de HIV-1, revelando portanto que as duas isoformas de fato possuem funções celulares distintas. Além disso, o direcionamento eficiente de CD4 por Nef para a degradação em lisossomos requer uma variante de AP-1, complexado com $\gamma 2$ e não com $\gamma 1$.

Diversos estudos anteriores já investigaram o papel dos complexos APs na regulação negativa de CD4 por Nef (Foti *et al.*, 1997; Piguet *et al.*, 1998; Rose *et al.*, 2005; Chaudhuri *et al.*, 2007; Leonard *et al.*, 2011). Nef interage com subunidades de pelo menos três dos cinco membros de uma família de APs de capa vesicular: AP-1, AP-2 e AP-3 (Janvier *et al.*, 2003; Chaudhuri *et al.*, 2007). Nef parece não interagir com AP-4 (Mattera *et al.*, 2011) e a interação com AP-5 ainda não foi relatada. Nef interage com os APs através dos motivos dileucinas conservados (D/EXXXL/I) presentes na proteína viral, que é reconhecido pelos hemicomplexos $\gamma 1$ - $\sigma 1$, $\gamma 2$ - σ , 1α - $\sigma 2$ and δ - $\sigma 3$ dos respectivos APs (Chaudhuri *et al.*, 2007; Doray *et al.*, 2007; Janvier *et al.*, 2003). Entretanto, em contraste com as demais interações, a interação de Nef com $\gamma 2$ - $\sigma 1$ demonstrou-se fraca pelo sistema de triplo-híbrido. Neste trabalho, pela técnica de *Pull-down*, confirmamos a interação de Nef com $\gamma 2$ -adaptina (Fig. 4).

O modelo mais aceito postula que AP-2 é necessário para a regulação negativa de CD4 por Nef (Chaudhuri *et al.*, 2007): Nef forma um complexo tripartite com AP-2 e com a cauda citosólica de CD4, acarretando na internalização de CD4 em vesículas revestidas por clatrina na membrana plasmática e, em uma etapa posterior, direcionando este receptor para a degradação lisossomal (Piguet *et al.*, 1998; Chaudhuri *et al.*, 2007; Gondim *et al.*, 2015; Ren *et al.*, 2014). Nosso trabalho procurou elucidar o papel da participação de AP-1 neste processo. Dessa forma, silenciando separadamente as

subunidades $\gamma 1$ e $\gamma 2$, foi possível observar que apenas a depleção de $\gamma 2$ acarretou no bloqueio da degradação de CD4 por Nef (Fig. 5). Além disso, o silenciamento de $\gamma 2$ também impediu a degradação de CD4 por Nef de diferentes cepas virais - Nef variantes NA7, 248 e SIVmac293 - (Fig. 6), indicando que a participação de $\gamma 2$ neste processo é conservada por diferentes cepas virais.

Já é sabido que Nef diminui os níveis de CD4 na membrana plasmática (Chaudhuri *et al.*, 2007; Gondim *et al.*, 2015) e este dado foi confirmado pelo presente trabalho (Fig. 7). No contexto deste processo, já foi relatado que o silenciamento da cadeia pesada de clatrina (CHC), da cadeia leve de clatrina (CLC), da subunidade $\mu 2$ de AP-2 e de α -COP acarretou no comprometimento da função de Nef de diminuir os níveis de CD4 na membrana plasmática (Chaudhuri *et al.*, 2007; Gondim *et al.*, 2015). Neste trabalho, encontramos que o silenciamento de $\gamma 2$, mas não de $\gamma 1$, também compromete este processo (Fig. 7 A, B), revelando, assim, mais uma importante molécula para a eficiente diminuição de CD4 por Nef na membrana plasmática.

As imagens geradas por microscopia confocal demonstraram que CD4 é redirecionado da membrana plasmática para regiões perinuclear em células expressando Nef (Fig. 8), corroborando com dados já publicados pela literatura (Amorim *et al.*, 2014; daSilva *et al.*, 2009). Algumas das estruturas positivas para CD4 em células expressando Nef, também contém $\gamma 2$ (Fig. 8), demonstrando uma co-localização alta de aproximadamente 64% de CD4 com $\gamma 2$ (Tab. 1), o que pode indicar que $\gamma 2$ -adaptina é recrutada para membranas que contêm CD4 internalizado. Além disso, o silenciamento de $\gamma 2$ impediu o redirecionamento de CD4 por Nef para regiões perinuclear, fazendo com que CD4 fique disperso pelo citoplasma (Fig. 8). Adicionalmente, a depleção de $\gamma 2$ acarreta no acúmulo de CD4 em endossomos primários em células expressando Nef (Fig. 9), uma vez que encontramos um aumento (de aproximadamente 27% para 70%; Tab. 1) da co-localização de CD4 com EEA1 (Fig. 9). Em conjuntos, estes resultados reforçam a ideia de que $\gamma 2$ -adaptina é necessária para a degradação de CD4 por Nef.

A marcação de $\gamma 2$ -adaptina na Fig. 8 nos indicou que $\gamma 2$ está presente na região perinuclear e também disperso pelo citoplasma. A fim de compreender melhor o papel de $\gamma 2$ na regulação negativa de CD4 por Nef, foi feito um estudo comparativo da distribuição de $\gamma 2$ com alguns marcadores celulares. Por imunofluorescência indireta, conseguimos perceber que as marcações para $\gamma 2$ se encontravam separadas das

estruturas positivas para $\gamma 1$, embora uma fração pequena de $\gamma 2$ se colocaliza com $\gamma 1$ (~34%, Fig. 11, Tab. 1). Isto indica que provavelmente as isoformas são recrutadas para membranas celulares distintas e, desta forma, podem participar de transporte de proteínas a partir de diferentes locais. Além disso, apesar de uma baixa co-localização com EEA1 (~26%, Fig. 11, Tab. 1) e com CD63 (~17%, Fig. 11, Tab. 1), $\gamma 2$ apresentou uma co-localização parcial com marcador proteico de endossomos primário e de reciclagem, como o receptor de transferrina (TfR) (~42%, Fig. 11, Tab. 1). Desta forma, pode-se concluir que $\gamma 2$ -adaptina, além de ser recrutado para a região perinuclear, é também recrutado para membranas de compartimentos endossomais dispersos pelo citoplasma, diferentemente de $\gamma 1$ -adaptina cuja localização parece estar mais restrita a região perinuclear (Fig. 11).

A literatura já reportou que $\gamma 2$ é capaz de interagir com as outras subunidades do complexo AP-1 (Mattera *et al.*, 2011; Takatsu *et al.*, 1998) e, portanto, pode ser capaz de formar uma variante AP-1. Entretanto, até agora, não há resultados funcionais na literatura para discernir se $\gamma 2$ opera em sua forma monomérica ou como uma subunidade do complexo AP-1. Neste trabalho demonstramos que a estabilidade das duas isoformas de γ -adaptina é severamente comprometida na ausência de $\mu 1A$ (Fig. 10), indicando que $\gamma 1$ e $\gamma 2$ funcionalmente operam como parte de um complexo AP-1. De fato, já foi previamente demonstrado que a ausência de uma das subunidades de complexos AP acarreta na instabilidade do complexo, o qual se desmonta, resultando na diminuição dos níveis das demais subunidades (Meyer *et al.*, 2000; Motley *et al.*, 2003; Peden *et al.*, 2002). Além disso, depleção de $\mu 1A$ parcialmente bloqueia a degradação de CD4 mediada por Nef (Fig. 10). Entretanto, o efeito inibitório neste processo foi fraco quando comparado com o efeito acarretado pela depleção de $\gamma 2$ (Fig. 5 e Fig. 6). Este fato pode ser consequência da co-depleção de moléculas de AP-1 compostas por $\gamma 1$, uma vez que a ausência das duas variantes do complexo AP-1 poderia favorecer vias mediadas por outros APs que utilizam co-fatores comuns, como o AP-2. Adicionalmente, já foi previamente proposto que a depleção de AP-2 aumenta vias dependentes de AP-1 (Lubben *et al.*, 2007). Em conjunto, estes resultados indicam que $\gamma 2$ provavelmente é parte de uma variante do complexo AP-1 envolvida no direcionamento de CD4 por Nef de HIV-1.

A depleção de Alix ou TSG101 (ESCRT-I) também bloqueiam a degradação de CD4 induzida por Nef, mas não altera os níveis deste receptor na membrana plasmática

(Amorim *et al.*, 2014; daSilva *et al.*, 2009). Este fato sugere que Alix participa do direcionamento de CD4 por Nef para a via ESCRT/MVB após moléculas de CD4 estarem já segregadas de domínios endossomais comprometidos com a reciclagem de proteínas de volta para a membrana plasmática (endossomos - membrana plasmática). Entretanto, encontramos que a depleção $\gamma 2$ compromete a diminuição dos níveis de CD4 por Nef na membrana plasmática (Fig. 8) e leva à acumulação deste receptor em endossomos primários (Fig. 9). Além disso, estabilizando ESCRT-I, via super-expressão de HRS (Bache *et al.*, 2003; Bishop *et al.*, 2002), encontramos $\gamma 2$ acumulado em endossomos dilatados contendo HRS-GFP, que também co-localiza com CD4 que foi internalizado por Nef (Fig. 12). Em conjunto, estes dados sugerem que a atividade de $\gamma 2$ ocorre em compartimentos pré-lisossomais, participando do direcionamento de CD4 por Nef para a via ESCRT/MVB. Este fato corrobora com o dados já publicados que $\gamma 2$ interage com subunidades de ESCRT-I e ESCRT-III e que a depleção de $\gamma 2$ impede a degradação lisossomal de HIV Gag, acarretando no aumento na liberação de VLPs (*Virus-like particles*) (Döring *et al.*, 2010). Portanto, as nossas evidências, juntamente com dados já publicados, reforçam a ideia que $\gamma 2$ funcionalmente possui um papel importante no tráfego intracelular de proteínas, especificamente no sistema endo-lisossomal.

Em resumo, a eficiente degradação de CD4 para lisossomos mediada por Nef requer a participação de $\gamma 2$ e que esta proteína compõe uma variante do complexo AP-1 (Fig. 13) que é funcionalmente distinto do AP-1 canônico, contendo a subunidade $\gamma 1$. Ademais, Nef modula negativamente outras proteínas da células hospedeira, como CD8, CD28, CXCR4, CCR5, CD80/CD86, MHC-I, SERINC3 e SERINC5 (Garcia & Foster, 2008; Landi *et al.*, 2011; Leonard *et al.*, 2011; Lubben *et al.*, 2007; Münch *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2015; Usami *et al.*, 2015) e esta ação de Nef é importante para o desenvolvimento da patogênese do HIV-1 e para a progressão da AIDS (Sugden *et al.*, 2016). Portanto, é interessante verificar se a variante de AP-1 contendo a subunidade $\gamma 2$ também é requerida para a regulação negativa mediada por Nef destas outras moléculas.

Figura 13. **AP-1, contendo a subunidade $\gamma 2$, participa do direcionamento de CD4, mediada por Nef, para a via ESCRT/MVB.** Nef forma um complexo tripartite com AP-2 e com a cauda citosólica de CD4, acarretando na internalização de CD4 em vesículas revestidas por clatrina na membrana plasmática. Após a endocitose, o receptor é direcionado para o endossomos primários, e posteriormente, para a degradação lisossomal, transitando pela via ESCRT/MVB. Os resultados obtidos neste trabalho propõem que AP-1, contendo a subunidade $\gamma 2$ -adaptina, atua na via pós-endocítica, possivelmente influenciado no tráfego em direção ao MVBs. Desta forma, esta variante de AP-1 facilita o direcionamento de CD4 por Nef para os MVBs, atuando em uma etapa anterior a cascata da maquinaria ESCRT e de Alix. Nos MVBs, CD4 é incorporado nas vesículas intra-luminais, e estes irão se fundir com os lisossomos ou irão se maturar tornando-se lisossomos.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

Este trabalho trouxe um estudo funcional comparativo entre as duas isoformas de γ -adaptina no contexto da regulação negativa de CD4 por Nef de HIV-1. Os principais resultados revelaram que $\gamma 2$, mas não $\gamma 1$, é essencial para a degradação lisossomal de CD4 por Nef de diferentes cepas virais e para a eficiente diminuição dos níveis de CD4 por Nef na membrana plasmática. A depleção de $\gamma 2$ acarreta no acúmulo de CD4, retirados por Nef da membrana plasmática, em endossomos primários. Além disso, $\gamma 2$ é uma importante molécula para o direcionamento de CD4 por Nef para a via ESCRT/MVB, mostrando ser uma proteína relevante no sistema endo-lisossomal. Ademais, os resultados indicaram que as isoformas não só possuem funções distintas, mas também parecem compor complexos AP-1 com diferentes funções celulares. Estes estudos contribuíram para o melhor entendimento das funções de Nef que poderão também ajudar na melhor compreensão da patogênese do HIV e da síndrome relacionada. Em adição, o estudo contribuiu para o entendimento de processos fundamentais da regulação do tráfego de proteínas transmembrana no sistema endo-lisossomal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

ABRÀMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with ImageJ. **Bioph Inter**, v. 11, n. 7, p. 36-42, 2004.

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

ARYA, S. K.; GALLO, R. C. Three novel genes of human T-lymphotropic virus type III: immune reactivity of their products with sera from acquired immune deficiency syndrome patients. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 83, n. 7, p. 2209-2213, 1986.

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

BERGER, E. A.; MURPHY, P. M.; FARBER, J. M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. **Annu Rev Immunol**, v. 17, p. 657-700, 1999.

BISHOP, N.; HORMAN, A.; WOODMAN, P. Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates. **Jour Cell Bio**, v. 157, n. 1, p. 91-102, 2002.

BOEHM, M.; BONIFACINO, J. S. Adaptins: the final recount. **Mol Biol Cell**, v. 12, n. 10, p. 2907-2920, 2001.

BOWERS, K.; PITCHER, C.; MARSH, M. CD4: a receptor in the immune response and HIV infection. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 29, n. 6, p. 871-875, 1997.

CHAUDHURI, R. *et al.* Downregulation of CD4 by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Is Dependent on Clatrin and Involves Direct Interaction of Nef with the AP2 Clathrin Adaptor. **J Virol**, v. 81, n. 8, p. 3877-3890, 2007.

COFFIN, J. *et al.* What to call the AIDS virus?. **Science**, v. 321. n. 10. 1986.

COSTES, S. V. *et al.* Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. **Bioph Jour**, v. 86, n. 6, p. 3993-4003, 2004.

DORAY, B. *et al.* The gamma/sigma1 and alpha/sigma2 hemicomplexes of clathrin adaptors AP-1 and AP-2 harbor the dileucine recognition site. **Mol Biol Cell**, v. 18, n. 15, p. 1887-1896, 2007.

DÖRING, T. *et al.* γ 2-Adaptin is functioning in the late endosomal sorting pathway and interacts with ESCRT-I and-III subunits. **Bioch et Bioph Acta (BBA) Mol Cell Res**, v. 1803, n. 11, p. 1252-1264, 2010.

- DORES, M. R. *et al.* Alix binds a YPX(3)L motif of the GPCR PAR1 and mediates ubiquitin-independent ESCRT-III/MVB sorting. **J Cell Biol**, v. 197, n. 3, p. 407-419, 2012a.
- DORES, M. R. *et al.* AP-3 regulates PAR1 ubiquitin-independent MVB/lysosomal sorting via ALIX-mediated pathway. **Mol Biol Cell**, v. 23, n. 18, p. 3612-3623, 2012b.
- ENGELMAN, A.; CHEREPANOV, P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. **Nat Rev Micro**, v. 10, n. 4, p. 279-290, 2012.
- FOSTER, J. L.; GARCIA, J. V. HIV-1 Nef: at the crossroads. **Retrovirology**, v. 5, p. 84, 2008.
- FOTI, M. *et al.* Nef-mediated clathrin-coated pit formation. **J Cell Biol**, v. 139, n. 1, p. 37-47, 1997.
- FRANKEL, A. D.; YOUNG, J. A. HIV-1, fifteen proteins as an RNA. **Annu Rev Biochem**, v. 67, p. 1-25, 1998.
- FREED, E. O. HIV-1 assembly, release and maturation. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, n. 8, p. 484-496, 2015.
- FREED, E. O. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. **Virology**, v. 251, n. 1, p. 1-15, 1998.
- GONDIM, M. V. *et al.* AP-2 Is the Crucial Clathrin Adaptor Protein for CD4 Downmodulation by HIV-1 Nef in Infected Primary CD4⁺ T Cells. **J Virol**, n. 89, v. 24, p. 12518-12524, 2015.
- GOTTLIEB, M. S. Discovering AIDS. **Epidemiology**, v. 9, n. 4, p. 365-367, 1998.
- GRANT, B. D.; DONALDSON, J. G. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. **Nat Rev Mol Cell Bio**, v. 10, n. 9, p. 597-608, 2009.
- GREENE, W. C.; PETERLIN, B. N. Charting HIVs remarkable voyage through the cell: Basic science as passport to future therapy. **Nat Med**, v. 8, n. 7, p. 673-680, 2002.
- GRZESIEK, S. *et al.* The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. **Biochemistry**, v. 35, n. 32, p. 10256-10261, 1996.
- HAHN, B. H.; SHAW, G. M.; DECOCK, K. M. AIDS as zoonosis: scientific and public health implications. **Science**, v. 287, n. 5453, p. 607-614, 2000.
- HATZIOANNOU, T. *et al.* HIV-1-induced AIDS in monkeys. **Science**, v. 344, n. 6190, p. 1401-1405, 2014.
- HENRY, A. G. *et al.* The role of ubiquitination in lysosomal trafficking of δ -opioid receptors. **Traffic**, v. 12, n. 2, p. 170-184, 2011.

- HIRST, J. *et al.* The Fifth Adaptor Protein Complex. **Plos Biol**, v. 9, n. 10, p. 1-17, 2011.
- HIRST, J. *et al.* Interaction between AP-5 and hereditary spastic paraplegia proteins SPG11 and SPG15. **Mol Biol Cell**, v. 24, n. 16, p. 2558-2569, 2013
- HISLOP, J. N.; MARLEY, A.; VON ZASTROW, N. Role of mammalian vacuolar protein-sorting proteins in endocytic trafficking of a non-ubiquitinated G protein-coupled receptor to lysosomes. **J Biol Chem**, v. 278, n. 21, p. 22522-22531, 2004.
- HURLEY, J. H.; HANSON, P. I. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. **Nat Rev Cell Biol**, v. 11, n. 8, p. 556-566, 2010.
- HO, D. D. HIV-1 dynamics in vivo. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 9, n. 3, p. 76-77, 1995.
- JACQUELINE, D. R.; DOMS, R. W. Human immunodeficiency virus type 2. **J Gen Virol**, v. 83, n. 6, p. 1253-1265, 2002.
- JANVIER, K. *et al.* HIV-1 Nef stabilizes the association of a adaptor protein complexes with membranes. **J Biol Chem**, v. 278, n. 10, p. 8725-8732, 2003.
- KAPLAN, A. H.; MANCHESTER, M.; SWANSTROM, R. The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and required of release to occur with maximum efficiency. **J Virol**, v. 66, n. 10, p. 6782-6786, 1994.
- KATZMANN, D. J.; ODORIZZI, G.; EMR, S. D. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. **Nat Rev Mol Cell Bio**, v. 3, n. 12, p. 893-905, 2002.
- KIRCHHOFF, F. *et al.* Role of Nef in primate lentiviral immunopathogenesis. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 17, p. 2621-2636, 2008.
- LAMA, J. *et al.* Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. **Curr Biol**, v. 9, n. 12, p. 622-31, 1999.
- LEWIN, D. A. *et al.* Cloning, expression, and localization of a novel γ -adaptin-like molecule. **FEBS Letters**, v. 435, n. 2, p. 263-268, 1998.
- LI, P. L. *et al.* Phosphorylation of HIV Nef by c-AMP-dependent protein kinase. **Virology**, v. 331, n. 2, p. 367-374, 2005.
- LUBBEN, N. B. *et al.* HIV-1 Nef-induced Down-Regulation of MHC Class I Requires AP-1 and Clathrin but not PACS-1 and Is Impeded by AP-2. **Mol Biol Cell**, v. 18, n. 9, p. 3351-3365, 2007.
- MARLIM, M. H. EMERMAN, N. HIV-1 accessory proteins—ensuring viral survival in a hostile environment. **Cell Host Microbe**, v. 3, n. 6, p. 388-398, 2008.

- MATTERA, R. Conservation and diversification of dileucine signal recognition by adaptor protein (AP) complex variants. **J Biol Chem**, v. 286, n. 3, p. 2022-2030, 2011.
- MEYER, C. *et al.* μ 1A deficiency induces a profound increase in MPR300/IGF-II receptor internalization rate. **Jour Cell Sci**, v. 114, n. 24, p. 4469-4476, 2001.
- MIYAUCHI, K. *et al.* HIV Enters Cells via Endocytosis and Dynamin-Dependent Fusion with Endosomes. **Cell**, v. 137, n. 3, p. 433-134, 2009.
- MOTLEY, A. *et al.* Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. **Jour Cell Bio**, v. 162, n. 5, p. 909-918, 2003.
- MÜNCH, J. *et al.* Nef-mediated enhancement of virion infectivity and stimulation of viral replication are fundamental properties of primate lentiviruses. **J Virol**, v. 81, n. 24, p. 13852-13864, 2007.
- PALELLA, F. J. *et al.* Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. Hiv Outpatient Study Investigators. **N Engl J Med**, v. 338, n. 13, p. 853-860, 1998.
- PARK, S. Y.; GUO, X. Adaptor protein complexes and intracellular transport. **Biosci. Rep**, v. 34, n. 4, p. 381-389, 2014.
- PHIZICKY, E. M.; FIELDS, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. **Micro Rev**, v. 59, n. 1, p. 94-123, 1995.
- PEDEN, A. A. *et al.* Assembly and function of AP-3 complexes in cells expressing mutant subunits. **Jour Cell Bio**, v. 156, n. 2, p. 327-336, 2002.
- PIGUET, V. *et al.* Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the mu chain of adaptor complexes. **Embo J**, v. 17, n. 9, p. 2472-2481, 1998.
- RAIBORG, C. *et al.* Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. **Nat Cell Biol**, v. 4, n. 5, p. 394-398, 2002.
- RAIBORG, C.; STENMARK, H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 445-452, 2009.
- RAO, V. S. *et al.* Protein-protein interaction detection: methods and analysis. **Inter Jour Prot**, v. 2014, 2014.
- RATNER, L. *et al.* Complete nucleotide sequences of functional clones of the AIDS virus. **Aids Res Hum Retrov**, v. 3, n. 1, p. 57-69, 1987.7
- REN, X. *et al.* How HIV-1 Nef Hijacks the AP-2 clathrin adaptor to downregulate CD4. **Elife**, v. 3, n. e01754, p. 1-19, 2014.
- ROBINSON, M. S. Adaptable adaptors for coated vesicles. **Trends Cell Biol**, v. 14, n. 4, p. 167-1674, 2004.

- ROBINSON, Margaret S. Forty Years of Clathrin-coated Vesicles. **Traffic**, v. 16, n. 12, p. 1210-1238, 2015.
- ROSA, A. *et al.* HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. **Nature**, v. 526, n. 7572, p. 212-217, 2015.
- ROSE, J. J. *et al.* CD4 down-regulation by HIV-1 and simian immunodeficiency virus (SIV) Nef proteins involves both internalization and intracellular retention mechanisms. **Jour Bio Chem**, v. 280, n. 9, p. 7413-7426, 2005.
- RHEE, S. S.; MARSH, J. W. Human immunodeficiency virus type 1 Nef-induced down-modulation of CD4 is due to rapid internalization and degradation of surface CD4. **J Virol**, v. 68, n. 8, p. 5156-5163, 1994.
- ROSS, T. *et al.* Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. **Curr Biol**, v. 9, n. 12, p. 613-21, 1999.
- SCHWARZ, D. S. *et al.* Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, v. 115, n. 2, p. 199-208, 2003.
- SCHINDLER, M. *et al.* Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell surface expression are well conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles. **J Virol**, v. 77, n. 19, p. 10548-10556, 2003.
- SHUGARS, D. C. *et al.* Analysis of human immunodeficiency virus type 1 nef gene sequences present in vivo. **J Virol**, v. 67, n. 8, p. 4639-4650, 1993.
- SILVA, E. M. L. Identificação de fatores celulares envolvidos na regulação negativa do coreceptor CD4 por Nef do HIV-1. 2014.
- SUGDEN, S. M. *et al.* Remodeling of the Host Cell Plasma Membrane by HIV-1 Nef and Vpu: A Strategy to Ensure Viral Fitness and Persistence. **Viruses**, v. 8, n. 3, p. 67, 2016.
- SWAIN, S. L. T cell subsets and the recognition of MHC class. **Immunol Rev**, v. 74, n. 1, p. 129-142, 1983.
- TAKATSU, H. *et al.* Identification and characterization of novel clathrin adaptor-related proteins. **Jour Bio Chem**, v. 273, n. 38, p. 24693-24700, 1998.
- UNAIDS. AIDS by the numbers, 2015.
- USAMI, Y.; WU, Y.; GÖTTLINGER, H. G. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. **Nature**, v. 526, n. 7572, p. 218-223, 2015.
- WILDUM, S. *et al.* Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection. **J Virol**, v. 80, n. 16, p. 8047-59, Aug 2006.

WOODCKO, D. M. *et al.* Quantitative evaluation of Escherichia coli host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and page recombinants. **Nucleic Acid Res**, v. 17, p. 9, p. 3469-3478, 1989.

WYATT, R.; SODROSKI, J. The HIV1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. **Science**, v. 280, n. 5371, p. 1884-1888, 1998.