UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR

Participação de proteínas da via secretória no tráfego e montagem do vírus sincicial respiratório

RICARDO DE SOUZA CARDOSO

RIBEIRÃO PRETO

2016

RICARDO DE SOUZA CARDOSO

**Participação de proteínas da via secretória no tráfego e montagem do vírus sincicial
respiratório**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto, como parte
das exigências para a obtenção do título
de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular de Vírus
Orientador: Prof. Dr. Eurico Arruda.

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Cardoso, Ricardo de Souza

Título: Participação de proteínas da via secretória no tráfego e montagem do vírus sincicial respiratório

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

Ribeirão Preto, 2016.

Orientador: Eurico Arruda

- 1.** HRSV. **2.** Secretória. **3.** Sorting nexin 2 (SNX2). **4.** Trans-Golgi Network 46 (TGN46).
- 5.** Incorporação de proteínas celulares no vírus. **6.** Corpos de inclusão.
- 7.** Tráfego intracelular de proteínas virais.

Agradecimentos

Aos ratos. Dedico a eles essa dissertação de mestrado.

Aos camundongos todos, os coelhos, cabras, cavalos. Peço-lhes desculpas por invadir-lhes sem se quer pedir licença e, agradeço pela não espontânea colaboração. Peço também desculpas pelo fato de não lhes dar escolha que não seja outra, de um caminho, por vezes, sem volta.

Espero que nós, humanos, que lhes tiramos tanto partido, tenhamos cada vez mais respeito e gratidão. E que saibamos o quanto (muito para além do dinheiro) custou, cada gota de anticorpo, soro, e afins.

É claro que agradeço aos meus pais, mas eles tiveram o direito de escolha quando outrora me fizeram. Sei que pela criação que fora me dada, não serão vaidosos a ponto de pensar que os desmereço ao dedicar aos bichos essa dissertação. Pois assim como esse “cara” que vos escreve, vejo nos olhos de cada ser que compõe a minha família amor e respeito pela vida.

Agradeço a cada ancestral que propagara seus genes até que me tornasse fruto de sua derivada existência: meus avós, em especial Therezinha de Jesus Soares, que de um modo no mínimo peculiar me fizera estudar tanta biologia celular para explicar os fenômenos patológicos mais diversos e principalmente daqueles relacionados à doenças que achava ela que as tinha.

Agradeço a todos, todos os meus amigos. Vocês sabem quem são: *Goonies barretenses*. Sinto por não citar um-por-um aqui, porém espero que entendam que estou apenas redigindo um texto de agradecimento e não a *Ilíada de Homero*.

Katsumasa Hoshino. Não poderia deixar de lembrar esse professor que sempre entusiasmado com ciência foi peça importante no meu encorajamento para seguir esse caminho. “Não se importe com as DP’s que adquirira ao longo de sua graduação, ser pesquisador é muito mais que notas, tenha iniciativa e entusiasmo que as coisas lhe darão certo” dizia ele. Acho que tinha razão.

Agradeço minha mãe por cada gota de suor de sua energia mais vital para que eu pudesse alcançar patamares cada vez mais elevados. Não atoa, no dia 8 de março nascera e lhe era dado o nome de Maria. Maria, Maria, Maria... Milton Nascimento sabia muito bem o que queria dizer quando escreveu essa música.

Agradeço ao meu padrasto David por todo o apoio e dedicação para que chegasse até aqui, sei que abdicou de muito para me ajudar, obrigado. Agradeço aos meus irmãos, Alan e Marcelo pelas conversas, e companheirismo.

Agradeço a todos meus familiares, sem exceção. Todos vocês fazem parte dessa conquista.

Agradeço ao professor Luis Lamberti por ter me aceito em seu laboratório o que foi a porta de entrada para a virologia. Gostaria de agradecer a todos de seu laboratório, pessoas cujas tenho muito apreço.

Não poderia deixar de agradecer ao professor Eurico por toda a ajuda e confiança quando me aceitou em seu laboratório e pela “*brotheragem*” que tem não só comigo, mas como todos do laboratório. Agradeço pelo entusiasmo com a ciência, tanto no laboratório quanto nas mesas de bar e churrascos da biocel. E saibam todas, que talvez pela primeira vez em décadas eu o convenci de me deixar pagar pelo menos uma coca cola.

Obrigado a todos do meu laboratório, você fazem as coisas ficarem mais leves.

Agradeço as agências de fomento CAPES, CNPq e Fapesp pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

Escrevo esse texto talvez com a sensação da personagem do início da música “Meu Guri” de Chico Buarque, “quando seu moço nasceu meu rebento, não era o momento dele rebentar”. Esse é um texto que vem nascendo com cara de fome e, de fato, nem nome eu tenho para lhe dar. Porém não há motivos de lamentações, quantos não foram os guris, que outrora nasceram assim, mas que com muito empenho “chegaram lá”, não é mesmo?

A verdade é que gostaria de agradecer muita gente, mas, como diria Caetano Veloso em uma de suas músicas “não tenho tempo... tempo... tempo...”.

Resumo

O vírus sincicial respiratório humano (HRSV) é o mais frequente agente patogênico da família Paramyxoviridae. Apesar de sua grande importância e impacto em saúde pública, alguns aspectos demandam elucidação. Entre eles, estão os mecanismos de tráfego intracelular de proteínas virais para o sítio de montagem. Baseado nisso, fizemos um estudo de imunofluorescência tentando contribuir para o entendimento da participação da via secretória no tráfego de proteínas estruturais de HRSV que não são glicosiladas: proteínas de matriz (M) e de nucleocapsídeo (N). Pudemos observar que essas proteínas seguem rota similar àquelas que são glicosiladas no Golgi, como a proteína de fusão (F). Ademais, as proteínas M e N, além de colocalizarem com proteínas celulares da via secretória, tais como trans-Golgi network-46 (TGN46) e sorting nexin-2 (SNX2), também influem no recrutamento de proteínas celulares para os corpos de inclusão virais, como mostrado no caso da proteína Glut1. Os dados indicam que proteínas M e N de HRSV seguem pela via endocítica inicial, acumulam-se em corpos de inclusão que seriam fábricas virais e, no caso de TGN46, podem ser incorporadas aos vírus em brotamento.

Palavras chave: 1.HRSV. 2.Secretória. 3. Sorting nexin 2 (SNX2). 4. Trans-Golgi Network 46 (TGN46). 5. Incorporação de proteínas celulares no vírus. 6. Corpos de inclusão. 7. Tráfego intracelular de proteínas virais.

Abstract

Human respiratory syncytial virus (HRSV) is the most relevant cause of respiratory infection in children worldwide. Despite its importance in public health, some aspects of the mechanisms of the trafficking of viral structural proteins remain unclear. In the present study, immunofluorescence was used to understand how the virus matrix (M) and nucleocapsid (N) proteins, which are non-glycosylated, are addressed to inclusion bodies in Hep-2 cells (MOI=3). M and N proteins followed similar intracellular trafficking routes as compared to the glycosylated fusion (F) viral protein. Moreover, M and N proteins co-localized with two key elements of the secretory pathway: trans-Golgi network-46 (TGN46) and sorting nexin-2 (SNX2). Viral proteins M and N appear to be involved in the recruitment of cell proteins at the formation of virus inclusion bodies, as shown for Glucose Transporter Type 1 (Glut1). The data suggest that HRSV M and N proteins follow the secretory pathway, initiating in early endosomes, as indicated by the co-localization with TGN46 and SNX2. In addition, these host cell proteins accumulate in inclusion bodies that are viral factories, and can be part of budding viral progeny. Therefore, HRSV M and N proteins, even though they are not glycosylated, take advantage of the secretory pathway to reach virus inclusion bodies. Confocal images suggest that SNX2, which is known for its membrane-deforming properties, could play a pivotal role in HRSV budding.

Keywords: 1. Human respiratory syncytial virus. 2. Early endosome. 3. Sorting nexin 2 (SNX2). 4. Trans-Golgi Network 46 (TGN46). 5. Cell proteins associated with virus particle. 6. Inclusion body. 7. Intracellular trafficking of the viral proteins.

LISTA DE ABREVIATURAS

Arf6 - *ADP-Ribosylation Factor 6*

BSA – *Bovine serum albumin*

ESCRT – *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*

Glut1 – *Glucose transporter 1*

HRSV – *Human Syncytial Respiratory Virus*

IF - imunofluorescência

M – Coeficiente de *Manders*

MAVs - *Mitochondrial antiviral-signaling protein*

MDA5 - *Melanoma Differentiation-associated gene 5*

MVB – Corpo Multivesicular

N – Proteína do nucleocapsídeo

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

PFA – Paraformaldeído

PIP3 – Fosfatidilinositol 3-fosfato

PX – *Phox homology*

RSV – *Respiratory Syncytial Virus*

SNX2 – *Sorting nexin 2*

TGN – Rede Trans-Golgi

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura de HRSV.	16
Figura 2. Esquema do genoma de HRSV.	17
Figura 3. Sincício de HRSV.....	20
Figura 4. Esquema da replicação de paramyxovirus.....	21
Figura 5. Esquema de um complexo retromérico.	23
Figura 6. Colocalização da proteína F de HRSV com marcador de endossomo inicial SNX2.	33
Figura 7. Colocalização da proteína F de HRSV com o marcador de endossomo inicial SNX2 no tempo de 24 horas após infecção.....	33
Figura 8. Colocalização da proteína M de HRSV com o marcador de endossomo inicial SNX2.	34
Figura 9. Colocalização da proteína N de HRSV com marcador de endossomo inicial SNX2, 24 horas após a infecção.	35
Figura 10. Colocalização da proteína F de HRSV com o marcador da rede trans-Golgi TGN46.	37
Figura 11. Colocalização da proteína M de HRSV com TGN46.....	38
Figura 12. Colocalização da proteína N de HRSV com TGN46.	39
Figura 13. Imunofluorescência para a glicoproteína F de HRSV e TGN46.	40
Figura 14. Intensidade de colocalização de proteínas virais e TGN46.....	41
Figura 15. Colocalização das proteínas F, M e N de HRSV com SNX2 nas formações filamentosas da superfícies celular.....	42
Figura 16. Colocalização de Glut1 com proteína N em corpos de inclusão de HRSV.	43
Figura 17. Sequências de aminoácidos das proteínas M (A) e N (B) do HRSV cepa Long VR-26, conforme base de dados http://www.uniprot.org/	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Predição de domínios transmembrana.....	45
---	----

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
ÍNDICE	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 <i>O VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO</i>	15
1.2 <i>ENTRADA</i>	16
1.3 <i>REPLICAÇÃO VIRAL</i>	17
1.4 <i>TRÁFEGO INTRACELULAR DE PROTEÍNAS VIRAIS</i>	18
1.5 <i>MONTAGEM E BROTAMENTO</i>	19
1.6 <i>PATOGÊNESE VIRAL</i>	21
1.7 <i>SORTING NEXIN 2 (SNX2)</i>	22
1.8 <i>GLUCOSE TRANSPORTER 1 (GLUT1)</i>	23
1.9 <i>TRANS-GOLGI NETWORK E TRANS-GOLGI NETWORK 46 (TGN46)</i>	24
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 <i>VÍRUS, CÉLULAS E ANTICORPOS</i>	28
3.2 <i>IMUNOFLOURESCÊNCIA</i>	29
3.3 <i>ANALISE 'IN SILICO'</i>	30
4. RESULTADOS	32
4.1 <i>AS PROTEÍNAS M E N DE HRSV COLOCALIZAM COM O MARCADOR DE ENDOSSOMO INICIAL SNX2</i>	32
4.2 <i>AS PROTEÍNAS M E N DE HRSV COLOCALIZAM COM O MARCADOR DA REDE DE TRANS-GOLGI TGN46</i>	36
4.3 <i>TGN46 SE LOCALIZANOS CONTORNOS DOS CORPOS DE INCLUSÃO E NAS FORMAS FILAMENTOSAS DE HRSV EM BROTAMENTO</i>	39
4.4 <i>SNX2 COLOCALIZA COM AS PROTEÍNAS F E M DE HRSV, MAS NÃO COM A PROTEÍNA N</i>	41
4.5 <i>GLUT 1 É SEQUESTRADA PELOS CORPOS DE INCLUSÃO FEITOS POR M E N</i>	42

4.6	A NUCLEOPROTEÍNA DE HRSV TEM 3 IMPORTANTES DOMÍNIOS	
	TRANSMEMBRANA	43
5.	DISCUSSÃO	47
6.	CONCLUSÕES	53
7.	REFERÊNCIAS	55

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 O vírus sincicial respiratório humano

O vírus sincicial respiratório humano (HRSV), isolado pela primeira vez em 1955, é o mais frequente patógeno respiratório da família *Paramyxoviridae*. Em crianças, o HRSV pode causar bronquite, bronquiolite e pneumonia, mas o agente pode também causar doença grave em idosos e em pessoas imunossuprimidas [2]. Cerca de 95% da população mundial se infecta com HRSV nos 5 primeiros anos de vida, e essas infecções anualmente causam até 190.000 mortes entre crianças de todo o mundo [1].

HRSV é um vírus envelopado, com genoma de RNA de fita simples e polaridade negativa, que codifica 11 proteínas virais em 10 *open read frames* (ORFs) distribuídas na seguinte ordem de 3' para 5': proteínas não estruturais NS1 e NS2, proteína de nucleocapsídeo N, fosfoproteína P, proteína de matrix M, proteína hidrofóbica pequena (*small hydrophobic*) SH, proteína de adesão G, proteína de fusão F, proteínas reguladoras de transcrição e replicação M2-1 e M2-2, e polimerase L [2]. A distribuição das proteínas estruturais virais é esquematizada na **Figura 1**.

Figura 1. Representação esquemática da estrutura de HRSV. O genoma está envolto pela nucleoproteína (N) que forma o complexo de ribonucleoproteína (RNP); ancorados ao RNP há a fosfoproteína (P) ativadora da polimerase, e a polimerase viral (L). Além disso, o HRSV possui 3 proteínas no envelope viral, que são as proteína de fusão (F), de adesão (G) e a pequena proteína hidrofóbica (SH), e que interagem com a proteína de matriz (M).

1.2 Entrada

Para ligar-se e infectar uma célula, o HRSV se utiliza de suas proteínas de envoltório, principalmente F e G [3]. A proteína de fusão deve antes passar sofrer clivagens para que possa se tornar ativa e mediar a fusão com a membrana plasmática da célula hospedeira [4,5]. Já a função da proteína G é de adesão. A proteína G promove adesão do vírus com a membrana plasmática da célula alvo e então F promove a fusão entre membranas que resulta na liberação do genoma no interior da célula [2].

Já foi mostrado que a proteína G é dispensável para a entrada viral, visto que HRSV com o gene G deletado ainda foi capaz de entrar em células [2], mediante macropinocitose com ativação da proteína F [5]. Já as proteínas virais isoladas podem ser captadas pela célula por processo clatrina dependente [6]. Concomitante ao processo de entrada, proteínas estruturais do citoesqueleto, como microfilamentos de actina e receptores intracelulares (Rho-GTPase) são ativados, promovendo rearranjos do citoesqueleto, o que

favorece a entrada do vírus [5,7]. Quando células são tratadas com fármacos que desestruturam o citoesqueleto, tanto o processo de entrada quanto o brotamento viral são comprometidos [8].

1.3 Replicação viral

A replicação do HRSV ocorre no citoplasma da célula hospedeira. As proteínas P e L compõem o complexo da polimerase viral, que reconhece um promotor localizado na região *leader* 3'UTR (Figura 2), que antecede os genes, e encontra a sequência de início do primeiro gene e o transcreve até encontrar a sequência sinal em *cis* de terminação de transcrição, final do gene. O transcrito gerado a partir de cada gene é capeado e poli-adenilado, criando-se assim os RNAm. Entre dois genes consecutivos há uma região intergênica e, após esta, o processo de transcrição recomeça no gene seguinte. Desta forma, um painel de 11 RNAm virais são transcritos de modo independente. Outra função da polimerase é fazer uma cópia de RNA (+) de comprimento total, que é complementar ao genoma, e servirá de molde para a fabricação da síntese de genomas da progênie. O balanço entre transcrição e replicação de genoma viral é controlado pelas proteínas M2-1 e M2-2 [9,10].

O modelo atualmente mais aceito da produção de RNAm virais é que no decorrer do processo de transcrição a polimerase viral tende a perder afinidade pela fita-molde de RNA, de maneira que os últimos genes são menos transcritos, gerando um gradiente decrescente de concentração de RNAm de 3' para 5'.

Figura 2. Esquema do genoma de HRSV. Cada gene possui uma região iniciadora e uma região terminadora da transcrição. Há uma região leader (le) na extremidade 3' e uma região trailer (tr) na extremidade 5'.

1.4 Tráfego intracelular de proteínas virais

As proteínas virais são traduzidas no citoplasma das células hospedeiras e devem ser endereçadas até a região onde ocorre montagem de vírions, e que é muito variável entre diferentes famílias virais, podendo inclusive ocorrer no núcleo, como no caso dos vírus de DNA que não são poxvírus. Além de depender da formação de capsídios, o processo de montagem é complexo e inclui etapas essenciais como a incorporação de uma cópia do genoma e, na maioria das vezes, organização de um processo de aquisição de um envelope e seu brotamento a partir de uma membrana. Algumas proteínas virais são transportadas pelo tráfego de vesículas endossomais, tanto na entrada quanto na saída do vírus [11,12]. Alguns estudos mostram a participação da via de reciclagem endossomal, enquanto outros indicam participação de Rab11-FIP2 no tráfego, dispensando a maquinaria ESCRT para o endereçamento de proteínas virais [13]. Cumpre salientar que já foi mostrado que Rab11 desempenha papel importante na montagem de *vírions* de RNA de simples fita e polaridade negativa [14].

As proteínas do HRSV F, G e SH são glicosiladas no complexo de Golgi, em processo que é inerente à sua incorporação à progênie viral [15]. Tomando por base o que já foi descrito para a proteína F, essas glicoproteínas trafegam da rede trans-Golgi até a membrana plasmática em endossomos [16].

As proteínas estruturais N, P, L, M aparentemente não seguem a mesma rota. Já foi demonstrado, por exemplo, que M não colocaliza com Golgi [17]. Essas proteínas fazem parte da composição dos corpos de inclusão, volumosos agregados proteicos que podem ser vistos facilmente em células infectadas por RSV [18–21]. Além de agregar proteínas virais, corpos de inclusão contêm muitas proteínas da célula hospedeira, como componentes ribossomais, fragmentos de DNA ou RNA, e já foi reportado que sua estrutura pode ser dinâmica, indicando movimento de componentes associados ao corpo de inclusão e elementos solúveis no citosol. As ligações mais comuns entre componentes dos corpos de inclusão são não covalentes, iônicas ou combinações de ambas.

Curiosamente, a proteína M tem sinal de importação para o núcleo em sua constituição [22,23], e há estudos que mostram que M tem papel regulador na transcrição de genes da célula [24].

Muito pouco se sabe a respeito das vias de tráfego de proteínas não glicosiladas de HRSV, e o presente estudo focaliza as proteínas de matriz (M) e do nucleocapsídio (N), verificando sua associação com alguns marcadores de vias de tráfego celular.

1.5 Montagem e brotamento

Acredita-se que a montagem de HRSV ocorra na membrana plasmática, na parte apical de células polarizadas, utilizando a via apical de reciclagem de endossomos (ARE) [12]. A proteína M tem papel fundamental nesse processo, formando dímeros que efetuam sua função organizadora da montagem viral [25,26]. A cauda da proteína F desempenha papel importante no seu endereçamento ao sítio de montagem [12].

No sítio de montagem, em balsas lipídicas de caveolina-1, as proteínas virais precisam se arranjar espacialmente de maneira a favorecer a montagem e o brotamento viral através da membrana plasmática, que ocorrem com a formação de 'filamentos' que protrudem da superfície da célula hospedeira. Curiosamente, para que ocorra brotamento de HRSV, as proteínas de capsídio F, G e SH são dispensáveis. Porém, ao contrário, a proteína M é essencial, e na sua ausência o processo de montagem do vírus é grandemente amplamente [27,28]. HRSV tem predileção por balsas lipídicas de cuja composição participa caveolina-1, e já foi demonstrado que partículas virais podem conter essa proteína celular após brotarem da célula hospedeira [29,30].

Como mencionado anteriormente, a eficácia do brotamento de HRSV requer interação das partículas virais com o citoesqueleto, sendo RhoA e profilina os principais mediadores desse processo, que resulta na saída de vírus [7,31]. A proteína F se acumula na região apical de células polarizadas,

em um arranjo espacial propício para a montagem dos vírions em formação, com importante participação da sua citosólica [32]. Mutações nessa região afetam profundamente a localização de F, a montagem viral, a capacidade infectante das partículas virais, e a capacidade de F de produzir sincícios [33].

Os sincícios formam o efeito citopático mais característico de HRSV em células em cultura, e resultam da fusão dos citoplasmas de células adjacentes em uma grande formação com vários núcleos, mediada pela atividade da proteína F (Figura 3). O esquema geral da replicação está representado na Figura 4.

Figura 3. Sincício de HRSV. Na imagem de imunofluorescência podemos observar a delimitação da membrana plasmática em verde, com 3 núcleos compartilhando o mesmo citoplasma. Na foto a marcação em verde é para a nucleoproteína N, os núcleos estão em azul.

Figura 4. Esquema da replicação de paramyxovirus. HRSV se liga à célula pelas proteínas de superfície G e F (A), o que resulta na adesão e fusão do envelope viral com a membrana celular, e permite a exposição do genoma viral de polaridade (-) ao citoplasma (B). No citoplasma ocorrem dois processos: a replicação (E) e a transcrição de RNAs mensageiros (C), ambos efetuados pela RNA-polimerase viral, sob controle das proteínas M2-1 e M2-2. É possível notar que do RNA genômico (-) são feitos transcritos de comprimento total, ou antígenomas de RNA(+), que servirão como molde para produção de genomas da progênie. As proteínas SH, G e F devem passar tanto pelo retículo quanto pelo Golgi, e durante essa passagem são glicosiladas e endereçadas (D) para o sítio onde ocorre montagem (F), que culmina no brotamento (G) [70].

1.6 Patogênese viral

As maneiras pelas quais o HRSV interfere na biologia das células hospedeiras são diversas, e uma delas é alterar o ciclo celular por meio de ação de proteínas virais não estruturais sobre proteínas de *check point* celular, o que resulta em paradas do ciclo que são vantajosas para a proliferação viral [34]. As proteínas não estruturais NS-1 e NS-2 de HRSV podem suprimir apoptose e induzir o processo de degradação pelo proteossoma de STAT2, resultando na inibição da via de JAK-STAT e produção de interferon tipo-1 [35,36]. As proteínas não estruturais NS também podem interagir com histonas específicas, como por exemplo, a H2BD, e induzir sua ubiquitinação com

expressão do gene HOX [37]. A proteína de matriz M também é efetora da patogênese, já que forma corpos de inclusão com outras proteínas virais em processo que resulta em ativação de MAVs (*Mitochondrial antiviral-signaling protein*) e MDA5 (*Melanoma Differentiation-associated gene 5*), modulando negativamente a resposta imune inata [38]. NS-1 também pode interagir com MAVs de tal forma que essa interação seja vantajosa para o vírus [39]. Recentemente, foi demonstrado que a proteína N tem a curiosa capacidade de se localizar na membrana plasmática, impedindo a formação adequada da sinapse imunológica com células infectadas [40].

1.7 Sorting Nexin 2 (SNX2)

Sorting nexin 2 (SNX2) pertence a uma família de genes cujos membros possuem um domínio de ligação a um fosfoinosítídeo, denominado de PX [41]. Os produtos desses genes fazem parte de um complexo retrômero que participa no endereçamento da proteína para a via endocítica. Variações nessa proteína se devem aos processos de *splicing* alternativo do gene [42].

Pela sua grande importância, é de se esperar que o desarranjo funcional dessas proteínas produza desequilíbrios no tráfego intracelular, acarretando doenças como o mal de *Alzheimer*, e é de se esperar que a atividade de *sorting nexins* se altere em presença de patógenos [43,44].

É importante salientar que SNX2 tem papel importante no processo de formação de vesículas endossomais iniciais tubulares, de diâmetro menor ou igual a 60nm [45]. A proteína SNX2 tem em sua estrutura um domínio Bin–Amphiphysin–Rvs (BAR) (Figura 5), que lhe confere capacidade deformadora de membranas para a formação de vesículas endossomais [46].

Figura 5. Esquema de um complexo retromérico. A figura mostra o complexo heteropentamérico que compõe as *sorting nexins*. Estão evidenciados o domínio PX que promove o dobramento de membranas nas regiões de fosfatidil inositol, o dímero BAR que é responsável por dar rigidez, e as proteínas acessórias Vps. Ainda na figura é mostrada uma carga a ser transportada por meio de formação de vesículas mediadas pelo complexo SNX (<http://www.nature.com/nrm/journal/v9/n7/full/nrm2427.html#B1>)

1.8 Glucose Transporter 1 (GLUT1)

As proteínas Glut fazem parte de uma grande família de receptores celulares de domínio transmembrana, que carregam moléculas de açúcar para o interior das células. Glut1 é um receptor de membrana plasmática expresso em uma diversidade muito ampla de células. Glut1 é uma proteína de membrana que segue a rota canônica de transporte da via secretora, até chegarem à membrana plasmática [47]. Sua síntese tem início no retículo endoplasmático, passando pelas cisternas do Golgi, até ser endereçada para a membrana plasmática por vesículas secretoras [48].

Estudos recentes têm mostrado que Glut1 depende de Akt para seu tráfego até a membrana plasmática, o que ficou evidenciado quando células são tratadas com Wortmannin, um inibidor de PIP3, que resulta em parada do tráfego [49]. Além disso, assim como o receptor Glut4, o Glut1 também participa da via de reciclagem endossomal [50].

1.9 *Trans-Golgi Network e trans-Golgi network 46 (TGN46)*

O complexo de Golgi é uma organela celular responsável pelo processo de glicosilação, empacotamento e endereçamento de proteínas. O Golgi pode ser dividido em três compartimentos contínuos principais: o cis-Golgi, que é voltado para o retículo endoplasmático, mais especificamente para o *endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment* (ERGIC); a rede medial do Golgi que fica entre cis e trans-Golgi; e o a rede trans-Golgi (trans-Golgi network, TGN), que se volta na direção da membrana plasmática [51]. A TGN compõe a maior estação da via secretória, que faz “sorting” proteico de endereçamento para diferentes compartimentos subcelulares. Além disso, o TGN pode receber proteínas de outros compartimentos subcelulares como, por exemplo, vesículas endossomais [52].

Trans-Golgi Network-46 (TGN46) é um marcador molecular para localização subcelular das cisternas do trans-Golgi, e portanto serve para evidenciar o papel que a TGN tem no tráfego de proteínas virais, como de HRSV.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi testar a participação de algumas proteínas que são marcadoras da via secretória, no processo de transporte de proteínas estruturais não glicosiladas de HRSV.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Vírus, células e anticorpos

Foi utilizado um estoque de HRSV preparado com a cepa Long A (VR-26), propagado em célula HEP-2 e titulado pelo ensaio de placa de lise, e mantido em estoque em freezer -80°C. O ensaio de placa foi feito com diluições decimais seriadas do estoque viral em MEM 2%, que foram inoculadas em culturas confluentes de células HEP-2 e incubadas por 1 hora em um *rocker*. A seguir, a monocamada foi coberta com agarose a 0.3% em DMEM-F12, à temperatura de 40°C, e incubada em estufa de CO₂ a 37°C por 6 dias. Decorrido este período, as células foram fixadas com formaldeído. secadas à temperatura ambiente e coradas com vermelho neutro por 1 hora, e a seguir lavadas com PBS. O título de HRSV obtido foi de 5×10^6 pfu/mL.

Foram usadas células de uma linhagem de adenocarcinoma de laringe (Hep-2), crescidas em meio MEM com 10% de soro fetal bovino, 1% de L-Glutamina e 1% de antibiótico e antimicótico. As células foram armazenadas em estufa de CO₂ a 37°C. Monocamadas de células Hep-2 foram tripsinizadas para fazer repiques em placas de 24 cavidades contendo lamínulas de 13mm de diâmetro, estéreis. Infecções com HRSV foram feitas em MEM 2% de soro bovino fetal, com MOI= 3. Após inoculação com estoque de HRSV, culturas foram incubadas por 1 hora a 4°C para adsorção viral e em seguida o inóculo foi retirado, foi adicionado meio MEM 2% fresco, para permitir a entrada viral a 37°C. No tempo de 24 h após infecção as culturas foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 10 minutos, e em seguida lavadas 10 vezes com PBS 1x e armazenadas em geladeira com 1ml de PSB.

Os anticorpos primários utilizados no ensaio de imunofluorescência foram os seguintes alvos: camundongo anti-proteína N de HRSV marcado com FITC 1:90 (Millipore, Mab858-3F); camundongo anti-proteína F de HRSV marcado com alexa flúor 488 1:100 (Millipore, Mab8262X); coelho anti-TGN46 1:250 (Millipore ABT95); coelho anti- SNX2 1:750 (Thermo-Fisher Mab PA523281); coelho anti-GLUT1 C-20 1:50 (Santa Cruz, SC1605). Todas as

diluições foram feitas em PBS com 3% de albumina sérica bovina (BSA). Os anticorpos secundários utilizados foram: cabra anti-coelho 1:500 (Abcam 594, AB150080); cabra anti-camundongo 1:1500 (Abcam 647, 150115). O anticorpo de camundongo anti-proteína M de HRSV foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Armando Moraes Ventura do ICB-USP, e foi usado na concentração de 1:90.

3.2 Imunofluorescência

Foram usados métodos de imunofluorescência direta e indireta. Inicialmente as concentrações dos anticorpos que foram usados foram padronizadas em testes individuais, e somente depois aplicados em conjunto, para comarcações. Após serem fixadas, as células infectadas com hRSV e células controles não infectadas foram incubadas com solução de permeabilização (Triton 0,01% em PBS) por 20 minutos, seguindo-se bloqueio com 3% de BSA diluída em PBS por meia hora a 37°C. Após o bloqueio, as células foram lavadas 10 vezes com PBS e incubadas com anticorpos primários, no volume de um gota de 10ul depositada em parafilm sobre a qual foram invertidas as lamínulas, em câmara úmida, seguindo-se incubação a 37°C por 1 hora. Após esse processo, as lamínulas foram devolvidas às cavidades das placas, lavadas com 10 trocas de PBS, e incubadas com mistura de anticorpos secundários e DAPI, depositada em parafilm sobre a qual foram invertidas as lamínulas. Seguiu-se incubação por 1 hora, seguida de lavagem com 20 trocas de PBS. Em seguida as lamínulas foram montadas em lâminas com solução de montagem e guardadas em temperatura ambiente *overnight* até serem visualizadas em microscópio confocal.

Nos experimentos em que foi necessário usar concomitantemente anticorpos feitos na mesma espécie, um deles era um anticorpo diretamente marcado, seguindo-se protocolo de imunofluorescência direta, e este foi usado sempre depois que o ensaio de imunofluorescência indireta foi feito com o outro anticorpo. Nesses casos, as lavagens foram feitas com 35 trocas de PBS. Todos os ensaios foram analisados em microscópio confocal no Centro de Imagens do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de

Medicina de Ribeirão Preto. Para o processamento de algumas imagens e para cálculos estatísticos foi utilizada ferramenta do software Image J.

3.3 Analise '*in silico*'

As análises de predições de domínios trans-membrana das proteínas M e N de HRSV foram feitas com uso de ferramentas do site http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html. As sequências de aminoácidos das proteínas virais foram obtidas do site <http://www.uniprot.org/>.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 As proteínas M e N de HRSV colocalizam com o marcador de endossomo inicial SNX2

Na tentativa de averiguar como proteínas estruturais não glicosiladas de HRSV alcançam os sítios de montagem, aonde também chegam as glicoproteínas virais, foi feita imunofluorescência indireta para marcar as proteínas M e N, juntamente com o marcador de endossomos iniciais SNX2.

Já era sabido que a proteína F de HRSV é transportada até o sítio de montagem viral por endossomos iniciais, mas nenhum estudo havia ainda utilizado SNX2 como marcador. Observamos que a proteína de Fusão F se colocaliza parcialmente com SNX2, tanto nos tempos de 12 horas (Figura 6), quanto de 24 horas (Figura 7) pós-infecção.

Surpreendentemente, foi observado que as proteínas não glicosiladas M e N de HRSV, também colocalizam com o marcador de endossomos iniciais SNX2 às 24 pós-infecção (Figuras 8 e 9). Ressaltamos que este é um achado inédito.

Figura 6. Colocalização da proteína F de HRSV com marcador de endossomo inicial SNX2. Em A, é possível ver que a proteína F de HRSV está concentrada em um dos polos da célula às 12 horas após a infecção, e em B vemos a ampliação do merge da figura A destacando os pontos de colocalização.

Figura 7. Colocalização da proteína F de HRSV com o marcador de endossomo inicial SNX2 no tempo de 24 horas após infecção. O núcleo foi evidenciado com DAPI para facilitar a localização espacial da célula. É possível notar colocalização de SNX2 tanto na região próxima ao núcleo da célula quanto mais distante, correspondendo aproximadamente ao início das formas filamentosas de HRSV em brotamento.

Figura 8. Colocalização da proteína M de HRSV com o marcador de endossomo inicial SNX2. Pode-se notar claramente colocalização da proteína M com SNX2 às 24 horas pós-infecção. A marcação do merge distribui-se desde a zona perinuclear até as formações arredondada que são corpos de inclusão de HRSV.

Figura 9. Colocalização da proteína N de HRSV com marcador de endossomo inicial SNX2, 24 horas após a infecção. Em A é possível observar uma visão geral de duas células adjacentes que estão infectadas com HRSV, nas quais é possível ver os corpos de inclusão formados por N. Em B, vê-se em detalhe a colocalização (merge) de SNX2 com N, nos corpos de inclusão, especialmente no seu contorno, na forma de anel. Em C, é possível ver que o processo de colocalização não se dá com as formas filamentosas de HRSV em brotamento, marcados por N.

4.2 As proteínas M e N de HRSV colocalizam com o marcador da rede de trans-Golgi TGN46

As proteínas são endereçadas para a via endossomal por meio da rede trans-Golgi. Com base nisso, foi investigado se havia colocalização dessa estrutura celular com as proteínas virais não glicosiladas M e N. A glicoproteína F de HRSV foi usada como controle, visto que ele deve seguir esse trajeto.

Como esperado, a proteína F de HRSV colocalizou com TGN46 em tempos de 12 horas e 24 horas após a infecção (figura 10). Interessantemente, ambas as figuras mostram um processo de desarranjo de TGN46, que ao invés de estar concentrado em um ponto, se redistribuiu na célula de modo disperso. Isso está de acordo com um estudo prévio, que observou desorganização de organelas em célula infectada por HRSV.

Figura 10. Colocalização da proteína F de HRSV com o marcador da rede trans-Golgi TGN46. Em A vê-se marcação às 12 horas pós-infecção, e em B às 24 horas pós-infecção. Em ambos os casos, é possível observar colocalização muito evidente de F com a TGN46. A barra de escala representa 10um.

De modo até então inédito, foi possível constatar que as proteínas estruturais não glicosiladas de HRSV M e N, colocalizam com o marcador da rede trans-Golgi TGN46 (Figuras 11 e 12). Interessantemente, TGN46 localiza-se na periferia do corpo de inclusão, delineando a imagem em ‘anel’ do mesmo (Figura 12B). Além disso, TGN46 colocaliza com as formações filamentosas típicas de HRSV em brotamento (Figura 12E).

Figura 11. Colocalização da proteína M de HRSV com TGN46. Em A a colocalização de M com TGN46 às 12 horas pós-infecção, e portanto antes da formação de corpos de inclusão, é quase imperceptível. Em B, às 24 horas pós-infecção, já há corpos de inclusão formados, n nos quais há colocalização de M com TGN46 (setas).

Figura 12. Colocalização da proteína N de HRSV com TGN46. Em A: proteína N de RSV, em B: TGN46, em C: merge de A e B mostrando colocalização de M com TNG46 na região central correspondente ao trans-Golgi como melhor evidenciado em D; no anel do corpo de inclusão (D); e nas projeções filamentosas de HRSV em brotamento (E). A seta branca em B evidencia TGN46 claramente delineando o anel do corpo de inclusão.

4.3 TGN46 se localiza nos contornos dos corpos de inclusão e nas formas filamentosas de HRSV em brotamento

Um dado curioso que pudemos notar com relação à marcação para TGN-46, foi um aparente processo de retenção desse marcador, assemelhando-se ao arranjo espacial dos anéis formados pelos corpos de inclusão, principalmente como visto na marcação para N. Como a glicoproteína F não participa da formação de corpos de inclusão, foi usada marcação para esta proteína juntamente com TGN46, e ficou claro que a marcação para TGN46 no delineamento em anel do corpo de inclusão, não resulta de

vazamento entre filtros de fluorescência (Figura 13). Destacamos que a confirmação da presença de TGN46 no contorno do corpo de inclusão de HRSV é um dado inédito.

No decorrer dos experimentos, foi possível observar que as colocalizações das proteínas M e N com TGN46 eram sempre de intensidades diferentes. Para avaliar essa observação com maior precisão, foi feita a medida por meio da ferramenta de colocalização threshold do programa Fiji do ImageJ. Assim como os dados visuais, os estatísticos demonstram que de fato a colocalização das proteínas M e N de HRSV com TGN são significativamente diferentes, com coeficientes de 14,34% para M e 46,55% para N, segundo coeficiente de Manders (M) (Figura 14).

Figura 13. Imunofluorescência para a glicoproteína F de HRSV e TGN46. Em A: marcação nuclear por DAPI; em B: marcação para a glicoproteína F evidenciando típico aspecto filamentoso na superfície da célula; em C: marcação para TGN46 claramente evidenciando distribuição similar à de cospos de inclusão da figura 12A; em D: colocalização em pontos na periferia.

Figura 14. Intensidade de colocalização de proteínas virais e TGN46. A imagem “A” mostra um panorama geral de uma célula infectada com HRSV, em verde vemos a proteína de nucleocapsídeo (N), em vermelho o marcador de TGN46, e em roxo o marcador para proteína de matriz (M). Em branco estão as colocalizações com proteína M e em amarelo as colocalizações com a proteína N. Houve colocalização das proteínas virais M e N, e de TGN46 nas projeções filamentosas da membrana plasmática. Em B temos imagens ampliadas da região demarcada em branco da figura A. É possível observar que as intensidades de colocalização das proteínas M e N de HRSV com TGN46 são diferentes.

4.4 SNX2 colocaliza com as proteínas F e M de HRSV, mas não com a proteína N

Para investigar a possível participação de SNX2 no processo de brotamento de HRSV, imunofluorescências foram feitas 24h após a infecção para os marcadores F, M e N de HRSV e para SNX2. Pudemos observar que houve colocalização tanto da glicoproteína F quanto da proteína M, mas não da proteína N, na região onde ocorrem as formações filamentosas de HRSV em brotamento (Figura 15).

Figura 15. Colocalização das proteínas F, M e N de HRSV com SNX2 nas formações filamentosas da superfícies celular. Colocalização de SNX2 foi evidenciada com a glicoproteína F (A) e com a proteína M (B), mas não com a proteína N (C). A colocalização em A e B é evidente na periferia da célula, nas formações filamentosas do vírus em brotamento.

4.5 GLUT 1 é sequestrada pelos corpos de inclusão feitos por M e N

Com a finalidade de obter evidência adicional da passagem das proteínas M e N pelo trans-Golgi e da sua progressão na via secretória, foi feito um ensaio de imunofluorescência para a proteína Glut1. Glut1, receptor de glicose na superfície das células, é uma proteína é endereçada para a membrana plasmática via Golgi, e portanto é um bom marcador da via

secretória. Foi possível observar que a proteína viral N colocalizou com Glut1 na região do contorno dos corpos de inclusão. Curiosamente, no interior dos corpos de inclusão há marcação para GLUT1, indicando um processo de sequestro de proteínas no interior dos corpos de inclusão.

Figura 16. Colocalização de Glut1 com proteína N em corpos de inclusão de HRSV. É possível observar que há glut1 no interior e no contorno em anel dos corpos de inclusão. Essa imagem foi feita 24 horas após infecção – asterisco em branco.

4.6 A nucleoproteína de HRSV tem 3 importantes domínios transmembrana

Com a finalidade de compreender melhor porque as proteínas M e N de HRSV colocalizaram com TGN46 em diferentes intensidades, foi feita a avaliação *in silico* da existência de domínios hélices transmembrana nessas proteínas. Os dados comparativos das duas proteínas (Figura 17) revelaram que a proteína M de matrix não possui domínios hélices transmembrana com scores significativos, mas a proteína N possui três domínios transmembrana de fora para dentro e de dentro para fora, com scores acima de 1000 (Tabela 1). Essa análise usa como parâmetro scores acima de 500 como significantes. A

somatória dos scores permite prever que a hélice transmembrana que provavelmente existe na proteína N, quando ancorada à membrana, tem a porção N-terminal para fora.

A

10	20	30	40	50
METTYVNLHE	GSTYTAAYQY	NVLEKDDDDPA	SLTIWVFMFQ	SSMPADLLIK
60	70	80	90	100
ELANVNILVK	QISTPRGPSL	RVNINRSAL	LAQMPSKFTI	CANVSLDERS
110	120	130	140	150
KLAYDVTPC	EIKACSLTCL	KSKNMLTIVE	DLTMETLNPT	HDIALCEFE
160	170	180	190	200
NIVTSKVVII	PTYLRSISVR	NKDLNTLENI	TTEFNNAIT	NAKIIIPYSGI
210	220	230	240	250
LLVITVTDNK	GAFKYIKPQS	QFIVDLGAYL	EKESIYYVTI	NWHTATRFK

IMFNEI

B

10	20	30	40	50
MALSKVKLND	TLNRDQLLS	SKYTIQRSTG	DSIDTFNYDV	QKHINKLCGM
60	70	80	90	100
LLITEDANHK	FTGLIGMLYA	MSRLGREDTI	KILRDAGYHV	KANGVIVTTH
110	120	130	140	150
RQDINGKEMK	FEVLTSLSLT	TEIQINIEIE	SRSYKRMKLK	EMGEVAPEYA
160	170	180	190	200
HDSFDCGMII	LCIAALVITH	LAAGDRSGLT	AVIRRANNVL	KNEMERYKGL
210	220	230	240	250
LPRDIANSFY	EVFEKHPHFI	DVFVHFGIAQ	SSTRGGSRVE	GIFAGLFMNA
260	270	280	290	300
YGAGQVMLNW	GVLAKSVKNI	MLGHASVQAE	MEQVVEVYEV	AQKLGEAGF
310	320	330	340	350
YHILNNPKAS	LLSLTQFPHF	SSVVLGNAAG	LGIMGEYRST	PRNQDLYDAA
360	370	380	390	
KAYAEQLKEN	GVINYSVLDL	TAELELAIKH	QLNPEDNDVE	L

Figura 17. Sequências de aminoácidos das proteínas M (A) e N (B) do HRSV cepa Long VR-26, conforme base de dados <http://www.uniprot.org/>

Tabela 1. Predição de domínios transmembrana.

	HRSV Matriz	HRSV Nucleoproteína
Possibilidade de possuir hélices de dentro para fora	2	3
Probabilidade de possuir hélice de fora para dentro	1	3
Scores de domínio transmembrana de dentro para fora	309, do a.a. 30 até 49 282, do a.a. 189 até 207	1210, do a.a. 156 até 174; 728, do a.a. 239 até 259; 884, do a.a. 314 até 332
Scores de domínio transmembrana de fora para dentro	336, do a.a. 197 até 213	1325, do a.a. 156 até 172 604, do a.a. 241 até 260 1123, do a.a. 320 até 337
Probabilidade de ser uma proteína com hélice transmembrana	Provavelmente não é uma proteína transmembrana	3 fortes domínios transmembrana com a porção N-terminal para o lado de fora

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, foi averiguada a participação de proteínas que participam da via secretória no processo de formação dos corpos de inclusão de HRSV, e sua contribuição para o transporte de proteínas virais para o sítio de montagem.

Estudos recentes demonstraram, com base em experimentos feitos com brefeldina A, que a proteína N se localiza nas cisternas do trans-Golgi, e que esse processo poderia ser importante para o tráfego de N para o sítio de montagem de HRSV [40]. Os resultados do presente estudo confirmam isso, só que desta feita pelo uso de marcador apropriado TGN46 (Figura 12). Os autores do referido estudo [40] discorreram sobre o tráfego de N, especulando que este se daria por endossomos tardios, mediante marcação com LAMP1. Contrariamente, os resultados atuais demonstraram colocalização da proteína N com o marcador da via endossomal inicial SNX2 (Figura 9). Cumpre salientar que são escassos os estudos sobre tráfego de proteínas não glicosiladas levando à montagem de vírus envelopados em geral, e a presente contribuição é inédita, pois implica que o tráfego de N se dá pela via de endossomo inicial.

A maquinaria ESCRT é importante para o *sorting* de vesículas que formarão corpos multi-vesiculares, posteriormente endereçados para lisossomos. Curiosamente, assim como para o metapneumovirus aviário [53], que também pertence à família *Paramyxoviridae*, HRSV não depende da maquinaria ESCRT para o processo de brotamento da partícula viral [13]. Este processo em HRSV é controlado por Rab11-FIP2 que são proteínas que participam da via secretória de endossomos iniciais a partir do trans-Golgi [13].

É notável que SNX2 foi claramente vista se localizando no contorno do corpo de inclusão. Isso poderia sugerir uma participação do endossomo inicial na biogênese do corpo de inclusão, ou alternativamente, SNX2 solúveis no citosol poderiam se agregar a estes, por mecanismos ainda desconhecidos.

Sorting nexins são um grupo de proteínas que contêm um domínio de ligação a fosfolípides chamado PX (*phox homology*) [57]. Sorting nexin 2 participa da via de formação de endossomos iniciais [45]. Além disso, sorting

nexins têm propriedades deformantes de membrana envolvidas na criação de estruturas tubulares.

De modo semelhante à proteína N, a proteína de matrix M de HRSV também se colocou com o marcador de endossomos primários SNX2 (figura 8). Já é conhecido que a proteína M, assim como L, P e N, participa na composição de corpos de inclusão, e o presente estudo veio corroborar isso.

Até o presente momento, o papel da proteína M na montagem de paramyxovírus é considerado central, pois esta proteína promoveria o contato de nucleocapsídeos com as glicoproteínas do envoltório viral, assim colaborando na montagem de vírions, o que se daria na membrana plasmática [2]. Interessantemente, um estudo demonstrou que há interação da proteína F de HRSV com os corpos de inclusão, ainda no citoplasma, durante seu tráfego em direção à membrana plasmática [32], o que poderia representar uma etapa precoce do processo de montagem a ser concluído na superfície da célula. Os dados do presente estudo nos permitem hipotetizar que essa interação de F, durante seu tráfego, com os corpos de inclusão, permitiria que proteínas virais fossem levadas em direção à membrana plasmática, até pontos onde mais tarde se formariam os filamentos, que correspondem ao brotamento de novos vírions maduros da progênie.

No presente estudo, as intensidades de colocação de N e M com TGN46 foram significativamente diferentes, sugerindo que as acessibilidades dos anticorpos a epítomos de M e de N podem ser diferentes no microambiente do trans-Golgi (figura 14). Interessantemente, a proteína M, que é considerada organizadora da montagem da partícula viral, não possui domínios transmembrana, mas a proteína N do nucleocapsídeo sim. Isso sugere que a proteína N exerceria papel de ancoragem da proteína M, e permitiria que esta fosse 'puxada' para a membrana do trans-Golgi, de tal modo a reunirem-se na via endocítica inicial, de onde chegariam aos corpos de inclusão.

Os resultados presentes diferem dos relatados por outro estudo que não encontrou colocação da proteína M de HRSV com o Golgi [71]. No entanto, acreditamos que essa diferença pode ser devida ao tipo de marcador que

usamos, o TGN46, que é específico para o trans-Golgi, e diferente do marcador de Golgi que eles usaram, a aglutinina do germe do trigo.

Outro aspecto que diz respeito ao trans-Golgi foi demonstrado para o vírus da febre suína africana (ASFV), que é a dispersão dessa estrutura, o que provoca um prolongamento do tempo para o tráfego das proteínas que se destinam à membrana plasmática [54]. É interessante notar que ASFV também é um vírus envelopado, assim como HRSV, e no caso deste último, o presente estudo demonstrou dispersão do trans-Golgi, ainda que parcial. Interessantemente, ASFV parece adquirir seu envelope do retículo endoplasmático [55,56]. Então porque o trans-Golgi seria disperso no processo de montagem desses vírus, uma vez que suas membranas já teriam sido formadas no RE? Esse é um aspecto interessante a ser estudado, e no nosso entender, sugere que o trans-Golgi exerce um papel que vai além de fornecer membranas para os vírus envelopados, mas provê condições para juntar proteínas não glicosiladas essenciais à montagem de vírions, e que não são endereçadas pela via secretória.

Interessantemente, no presente estudo parte do trans-Golgi se destacou e se dispôs em forma de anel que circunda os corpos de inclusão.

Glut1 está ancorada à membrana plasmática e é um receptor de glicose. A produção de Glut1 é diretamente sensível à insulina, e seu tráfego intracelular se dá pela via de reciclagem de endossomos via Arf6 [58], com participação de RAB11 e de RAB5, que interagem com endossomos iniciais [59]. Portanto, a presença de Glut1 nos corpos de inclusão de HRSV, colocalizando com as proteínas N e M, indica a importância de endossomos iniciais no transporte dessas proteínas e na formação de corpos de inclusão. Assim como outros estudos demonstraram que os corpos de inclusão de HRSV podem capturar diversas proteínas celulares, como HSP70 e caveolina [60][30], também mostramos processo similar em relação a Glut1. Estudos adicionais são necessários para averiguar se Glut-1 tem um papel específico na montagem de vírus.

Corpos de inclusão reúnem diversas proteínas de HRSV, inclusive a polimerase viral L, as proteínas M, N e P, bem como RNPs contendo o genoma

[61], assim explicando os anéis vistos no filtro do DAPI na figura 16. Corpos de inclusão são fábricas virais contendo os diversos elementos para a formação de vírus, o que é inclusive reforçado pelo achado de proteína M de HRSV interagindo em corpos de inclusão com a proteína M2-1, que é uma proteína funcional regulatória do processo de replicação viral [62].

Tomadas em conjunto com dados de estudos já publicados, as evidências obtidas no presente estudo indicam que corpos de inclusão de HRSV são sedes de etapas precoces da montagem, disponibilizando material pre-montado para interagir com as glicoproteínas virais que estão trafegando em vesículas de endossomos iniciais trafegando nas proximidades. Esse arranjo dinâmico dá condições para a criação de partículas virais imaturas, a serem finalmente maturadas no processo de brotamento na membrana plasmática, nas formações filamentosas.

É notório que TGN46 colocaliza com HRSV em sua forma filamentar em brotamento na membrana plasmática, sugerindo que há retenção de proteínas celulares nas partículas virais.

SNX2 é conhecida pela sua capacidade deformadora de membranas [63], e poderia estar envolvida no processo de formação de filamentos de HRSV. O presente estudo indica que as *sorting nexins* podem exercer papel fundamental no processo de formação viral, uma vez que HRSV brota em forma filamentar. Vários vírus, como, por exemplo, HIV-1, influenza e Ebola brotam mediante a formação de filamentos de membrana na superfície da célula [65–68]. Curiosamente, SNX2 deforma membranas em forma filamentar, mediante sua ligação ao domínio de membranas PIP3. Inclusive, um estudo anterior demonstrou por experimentos de depleção de PIP3, que há formação de progênie viral defeituosa [64]. Além disso, como mencionado previamente, HRSV endereça suas proteínas virais para regiões ricas em lipídeos, as *lipid rafts* (balsas lipídicas), que são regiões ricas em PIP3 [69]. Assim, é lícito hipotetizar que SNX2, que se localiza nos corpos de inclusão de HRSV, exerceria papel crítico no processo de brotamento desse vírus, bem como de outros vírus envelopados que brotam de modo semelhante. Embora SNX2 se colocalize com as proteínas F, M e N de HRSV em endossomos iniciais e nos

corpos de inclusão, as formas filamentosas de HRSV em brotamento, SNX2 curiosamente só colocaliza com a glicoproteína F e com a proteína de matriz M. Com base nisso, é tentador especular que como a proteína N fica no centro dos filamentos, perderia a interação com SNX2, que se mantém na membrana, e assim está mais próxima de F e de M.

O presente estudo permitiu novos *insights* sobre a participação da via secretora no transporte de proteínas estruturais não glicosiladas de HRSV. Alguns dados obtidos são inéditos e lançam as bases para próximos estudos inovadores sobre montagem e brotamento de HRSV, com possíveis repercussões para outros vírus envelopados.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- i. As proteínas estruturais não glicosiladas de HRSV M e N colocalizam com o marcador de endossomo inicial SNX2 e da rede trans-Golgi TGN46, e portanto trafegam pela via secretória.
- ii. TGN46 se localiza em corpos de inclusão e nas formas filamentosas de HRSV em brotamento.
- iii. SNX2 colocaliza com a glicoproteínas F e com a proteína M, mas não com a proteína N, na forma filamentar em brotamento de HRSV.
- iv. GLUT 1, um marcador da via secretora, é sequestrada em corpos de inclusão.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

1. Nair H, Brooks WA, Katz M, Roca A, Berkley J a, Madhi S a, et al. Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* (London, England). Elsevier Ltd; 2011;378: 1917–30. doi:10.1016/S0140-6736(11)61051-9
2. Collins PL and RAK. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. In: Knipe MD, Howley, M P, editors. *Fields Virology*, 6th Edition. 6th ed. 2013. pp. 1086–1123.
3. Mastrangelo P, Hegele RG. RSV Fusion: Time for a new model. *Viruses*. 2013;5: 873–885. doi:10.3390/v5030873
4. Begon M, Garcı B, Albar JP, Calder L, Lo JA, Skehel JJ, et al. Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required.
5. Krzyzaniak MA, Zumstein MT, Gerez JA, Picotti P, Helenius A. Host cell entry of respiratory syncytial virus involves macropinocytosis followed by proteolytic activation of the F protein. *PLoS Pathog*. 2013;9: e1003309. doi:10.1371/journal.ppat.1003309
6. Gutierrez-Ortega a, Sanchez-Hernandez C, Gomez-Garcia B. Respiratory syncytial virus glycoproteins uptake occurs through clathrin-mediated endocytosis in a human epithelial cell line. *Virology*. 2008;5: 127. doi:10.1186/1743-422X-5-127
7. Gower TL, Pastey MK, Peebles ME, Peter L, Mccurdy LH, Hart TK, et al. RhoA Signaling Is Required for Respiratory Syncytial Virus-Induced Syncytium Formation and Filamentous Virion Morphology RhoA Signaling Is Required for Respiratory Syncytial Virus-Induced Syncytium Formation and Filamentous Virion Morphology. 2005; doi:10.1128/JVI.79.9.5326
8. Burke E, Dupuy L, Wall C, Barik S. Role of cellular actin in the gene expression and morphogenesis of human respiratory syncytial virus. *Virology*. 1998;252: 137–48. doi:10.1006/viro.1998.9471
9. Mason SW, Aberg E, Lawetz C, DeLong R, Whitehead P, Liuzzi M. Interaction between human respiratory syncytial virus (RSV) M2-1 and P proteins is required for reconstitution of M2-1-dependent RSV minigenome activity. *J Virol*. 2003;77: 10670–6. doi:10.1128/JVI.77.19.10670-10676.2003

10. Cheng X, Park H, Zhou H, Jin H. Overexpression of the M2-2 protein of respiratory syncytial virus inhibits viral replication. *J Virol.* 2005;79: 13943–52. doi:10.1128/JVI.79.22.13943-13952.2005
11. Kolokoltsov A a, Deniger D, Fleming EH, Roberts NJ, Karpilow JM, Davey R a. Small interfering RNA profiling reveals key role of clathrin-mediated endocytosis and early endosome formation for infection by respiratory syncytial virus. *J Virol.* 2007;81: 7786–800. doi:10.1128/JVI.02780-06
12. Brock SC, Goldenring JR, Crowe JE. Apical recycling systems regulate directional budding of respiratory syncytial virus from polarized epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100: 15143–8. doi:10.1073/pnas.2434327100
13. Utley TJ, Ducharme NA, Varthakavi V, Shepherd BE, Santangelo PJ, Lindquist ME, et al. Respiratory syncytial virus uses a Vps4-independent budding mechanism controlled by Rab11-FIP2. 2008;105: 10209–10214.
14. Bruce E a, Stuart A, McCaffrey MW, Digard P. Role of the Rab11 pathway in negative-strand virus assembly. *Biochem Soc Trans.* 2012;40: 1409–15. doi:10.1042/BST20120166
15. Collins PL, Mottet G. Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 1991;72 (Pt 12: 3095–101. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1765771>
16. Shaikh FY, Crowe JE. Molecular mechanisms driving respiratory syncytial virus assembly. *Future Microbiol.* 2013;8: 123–31. doi:10.2217/fmb.12.132
17. Henderson G, Murray J, Yeo RP. Sorting of the Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein into Detergent-Resistant Structures Is Dependent on Cell-Surface Expression of the Glycoproteins. *Virology.* 2002;300: 244–254. doi:10.1006/viro.2002.1540
18. Carromeu C, Simabuco FM, Tamura RE, Farinha Arcieri LE, Ventura a M. Intracellular localization of human respiratory syncytial virus L protein. *Arch Virol.* 2007;152: 2259–63. doi:10.1007/s00705-007-1048-4
19. García J, García-Barreno B, Vivo A, Melero JA. Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. *Virology.* 1993;195: 243–7. doi:10.1006/viro.1993.1366
20. Ghildyal R, Mills J, Murray M, Vardaxis N, Meanger J. Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. *J Gen Virol.* 2002;83: 753–7. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11907323>

21. Oliveira AP, Simabuco FM, Tamura RE, Guerrero MC, Ribeiro PGG, Libermann T a, et al. Human respiratory syncytial virus N, P and M protein interactions in HEK-293T cells. *Virus Res. Elsevier B.V.*; 2013;177: 108–12. doi:10.1016/j.virusres.2013.07.010
22. Ghildyal R, Ho A, Dias M, Soegiyono L, Bardin PG, Tran KC, et al. The respiratory syncytial virus matrix protein possesses a Crm1-mediated nuclear export mechanism. *J Virol.* 2009;83: 5353–62. doi:10.1128/JVI.02374-08
23. Ghildyal R, Ho A, Wagstaff KM, Dias MM, Barton CL, Jans P, et al. Nuclear import of the respiratory syncytial virus matrix protein is mediated by importin beta1 independent of importin alpha. *Biochemistry.* 2005;44: 12887–95. doi:10.1021/bi050701e
24. Ghildyal R, Baulch-Brown C, Mills J, Meanger J. The matrix protein of Human respiratory syncytial virus localises to the nucleus of infected cells and inhibits transcription. *Arch Virol.* 2003;148: 1419–1429. doi:10.1007/s00705-003-0112-y
25. Brown G, Rixon HWM, Sugrue RJ. Respiratory syncytial virus assembly occurs in GM1-rich regions of the host-cell membrane and alters the cellular distribution of tyrosine phosphorylated caveolin-1. *J Gen Virol.* 2002;83: 1841–50. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12124448>
26. Förster A, Maertens GN, Farrell PJ, Bajorek M. Dimerization of Matrix protein is required for budding of Respiratory Syncytial Virus. *J Virol.* 2015;89: JVI.03500–14. doi:10.1128/JVI.03500-14
27. Batonick M, Oomens AGP, Wertz GW. Human respiratory syncytial virus glycoproteins are not required for apical targeting and release from polarized epithelial cells. *J Virol.* 2008;82: 8664–72. doi:10.1128/JVI.00827-08
28. Mitra R, Baviskar P, Duncan-Decocq RR, Patel D, Oomens AGP. The human respiratory syncytial virus matrix protein is required for maturation of viral filaments. *J Virol.* 2012;86: 4432–43. doi:10.1128/JVI.06744-11
29. Ravid D, Leser GP, Lamb RA. A Role for Caveolin 1 in Assembly and Budding of the Paramyxovirus Parainfluenza Virus 5. *J Virol.* 2010;84: 9749–9759. doi:10.1128/JVI.01079-10
30. Brown G, Aitken J, Rixon HWM, Sugrue RJ. Caveolin-1 is incorporated into mature respiratory syncytial virus particles during virus assembly on the surface of virus-infected cells. *J Gen Virol.* 2002;83: 611–21. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11842256>
31. Bitko V, Oldenburg A, Garmon NE, Barik S. Profilin is required for viral morphogenesis, syncytium formation, and cell-specific stress fiber

- p>induction by respiratory syncytial virus. BMC Microbiol. 2003;3: 9. doi:10.1186/1471-2180-3-9
32. Oomens AGP, Bevis KP, Wertz GW. The cytoplasmic tail of the human respiratory syncytial virus F protein plays critical roles in cellular localization of the F protein and infectious progeny production. J Virol. 2006;80: 10465–10477. doi:10.1128/JVI.01439-06
 33. Shaikh FY, Cox RG, Lifland AW. A Critical Phenylalanine Residue in the Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Cytoplasmic Tail Mediates Assembly of Internal Viral. 2012; doi:10.1128/mBio.00270-11.Editor
 34. Martínez I, Lombardía L, García-Barreno B, Domínguez O, Melero J a. Distinct gene subsets are induced at different time points after human respiratory syncytial virus infection of A549 cells. J Gen Virol. 2007;88: 570–581. doi:10.1099/vir.0.82187-0
 35. Bitko V, Shulyayeva O, Mazumder B, Musiyenko A, Ramaswamy M, Look DC, et al. Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF-kappaB-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth. J Virol. 2007;81: 1786–1795. doi:10.1128/JVI.01420-06
 36. Jie Z, Dinwiddie DL, Senft AP, Harrod KS. Regulation of STAT signaling in mouse bone marrow derived dendritic cells by respiratory syncytial virus. Virus Res. Elsevier B.V.; 2011;156: 127–33. doi:10.1016/j.virusres.2011.01.007
 37. Tan Y-R, Peng D, Chen C-M, Qin X-Q. Nonstructural protein-1 of respiratory syncytial virus regulates HOX gene expression through interacting with histone. Mol Biol Rep. 2013;40: 675–9. doi:10.1007/s11033-012-2107-9
 38. Lifland AW, Jung J, Alonas E, Zurla C, Crowe JE, Santangelo PJ. Human respiratory syncytial virus nucleoprotein and inclusion bodies antagonize the innate immune response mediated by MDA5 and MAVS. J Virol. 2012;86: 8245–58. doi:10.1128/JVI.00215-12
 39. Boyapalle S, Wong T, Garay J, Teng M, San Juan-Vergara H, Mohapatra S, et al. Respiratory Syncytial Virus NS1 Protein Colocalizes with Mitochondrial Antiviral Signaling Protein MAVS following Infection. PLoS One. 2012;7: e29386. doi:10.1371/journal.pone.0029386
 40. Céspedes PF, Bueno SM, Ramírez B a, Gomez RS, Riquelme S a, Palavecino CE, et al. Surface expression of the hRSV nucleoprotein impairs immunological synapse formation with T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014; 1–10. doi:10.1073/pnas.1400760111

41. Teasdale RD, Loci D, Houghton F, Karlsson L, Gleeson P a. A large family of endosome-localized proteins related to sorting nexin 1. *Biochem J*. 2001;358: 7–16. doi:10.1042/0264-6021:3580007
42. Cullen PJ. Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9: 574–582. doi:10.1038/nrm2427
43. Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, Zou F, et al. The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet*. 2007;39: 168–177. doi:10.1038/ng1943
44. Alto NM, Weflen AW, Rardin MJ, Yarar D, Lazar CS, Tonikian R, et al. The type III effector EspF coordinates membrane trafficking by the spatiotemporal activation of two eukaryotic signaling pathways. *J Cell Biol*. 2007;178: 1265–78. doi:10.1083/jcb.200705021
45. Carlton JG, Bujny M V, Peter BJ, Oorschot VMJ, Rutherford A, Arkell RS, et al. Sorting nexin-2 is associated with tubular elements of the early endosome, but is not essential for retromer-mediated endosome-to-TGN transport. *Trends Cell Biol*. 2005;118: 4527–4539. doi:10.1242/jcs.02568
46. Shimada A, Niwa H, Tsujita K, Suetsugu S, Nitta K, Hanawa-Suetsugu K, et al. Curved EFC/F-BAR-Domain Dimers Are Joined End to End into a Filament for Membrane Invagination in Endocytosis. *Cell*. 2007;129: 761–772. doi:10.1016/j.cell.2007.03.040
47. Macheda ML, Williams ED, Best JD, Wlodek ME, Rogers S. Expression and localisation of GLUT1 and GLUT12 glucose transporters in the pregnant and lactating rat mammary gland. *Cell Tissue Res*. 2003;311: 91–97. doi:10.1007/s00441-002-0661-5
48. Yu Q, Zhu L, Lin J, Zhang Q, Tian Q, Hu W, et al. Functional Analyse of GLUT1 and GLUT12 in Glucose Uptake in Goat Mammary Gland Epithelial Cells. *PLoS One*. 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0065013
49. Von der Crone S, Deppe C, Barthel A, Sasson S, Joost HG, Schürmann A. Glucose deprivation induces Akt-dependent synthesis and incorporation of GLUT1, but not of GLUT4, into the plasma membrane of 3T3-L1 adipocytes. *Eur J Cell Biol*. 2000;79: 943–9. doi:10.1078/0171-9335-00118
50. Yang J, Holman GD. Comparison of GLUT4 and GLUT1 subcellular trafficking in basal and insulin-stimulated 3T3-L1 cells. *J Biol Chem*. 1993;268: 4600–4603.
51. Han HM, Bouchet-Marquis C, Huebinger J, Grabenbauer M. Golgi apparatus analyzed by cryo-electron microscopy. *Histochemistry and Cell Biology*. 2013. pp. 369–381. doi:10.1007/s00418-013-1136-3

52. Gu F, Crump CM, Thomas G. Trans-Golgi network sorting. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58: 1067–1084. doi:10.1007/PL00000922
53. Weng Y, Lu W, Harmon A, Xiang X, Deng Q, Song M, et al. The cellular endosomal sorting complex required for transport pathway is not involved in avian metapneumovirus budding in a virus-like-particle expression system. 2011; 1205–1213. doi:10.1099/vir.0.029306-0
54. Netherton CL, McCrossan M-C, Denyer M, Ponnambalam S, Armstrong J, Takamatsu H-H, et al. African swine fever virus causes microtubule-dependent dispersal of the trans-golgi network and slows delivery of membrane protein to the plasma membrane. *J Virol.* 2006;80: 11385–11392. doi:10.1128/jvi.00439-06
55. Rouiller I, Brookes SM, Hyatt a D, Windsor M, Wileman T. African swine fever virus is wrapped by the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 1998;72: 2373–87. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=109537&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
56. Andrés G, García-Escudero R, Simón-Mateo C, Viñuela E. African swine fever virus is enveloped by a two-membraned collapsed cisterna derived from the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 1998;72: 8988–9001. Available: <http://jvi.asm.org/content/72/11/8988.abstract>
57. Pylypenko O, Lundmark R, Rasmuson E, Carlsson SR, Rak A. The PX-BAR membrane-remodeling unit of sorting nexin 9. *EMBO J.* 2007;26: 4788–4800. doi:10.1038/sj.emboj.7601889
58. Eyster CA, Higginson JD, Huebner R, Porat-Shliom N, Weigert R, Wu WW, et al. Discovery of new cargo proteins that enter cells through clathrin-independent endocytosis. *Traffic.* 2009;10: 590–599. doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00894.x
59. Grant BD, Donaldson JG. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10: 597–608. doi:10.1038/nrm2755
60. Brown G, Rixon HWM, Steel J, McDonald TP, Pitt AR, Graham S, et al. Evidence for an association between heat shock protein 70 and the respiratory syncytial virus polymerase complex within lipid-raft membranes during virus infection. *Virology.* 2005;338: 69–80. doi:10.1016/j.virol.2005.05.004
61. Lindquist ME, Lifland AW, Utley TJ, Santangelo PJ, Crowe JE. Respiratory syncytial virus induces host RNA stress granules to facilitate viral replication. *J Virol.* 2010;84: 12274–12284. doi:10.1128/JVI.00260-10
62. Li D, Jans D a, Bardin PG, Meanger J, Mills J, Ghildyal R. Association of respiratory syncytial virus M protein with viral nucleocapsids is mediated

- by the M2-1 protein. *J Virol.* 2008;82: 8863–8870. doi:10.1128/JVI.00343-08
63. Rojas R, Kametaka S, Haft CR, Bonifacino JS. Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of retromer with endosomes and the trafficking of mannose 6-phosphate receptors. *Mol Cell Biol.* 2007;27: 1112–24. doi:10.1128/MCB.00156-06
 64. Yeo DS-Y, Chan R, Brown G, Ying L, Sutejo R, Aitken J, et al. Evidence that selective changes in the lipid composition of raft-membranes occur during respiratory syncytial virus infection. *Virology.* 2009;386: 168–82. doi:10.1016/j.virol.2008.12.017
 65. Rossman JS, Lamb RA. Influenza virus assembly and budding. *Virology.* 2011. pp. 229–236. doi:10.1016/j.virol.2010.12.003
 66. Chazal N, Gerlier D. Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67: 226–237, table of contents. doi:10.1128/MMBR.67.2.226-237.2003
 67. Popik W, Alce TM, Au W. Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J Virol.* 2002;76: 4709–4722. doi:10.1128/JVI.76.10.4709-4722.2002
 68. Bavari S, Bosio CM, Wiegand E, Ruthel G, Will AB, Geisbert TW, et al. Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses. *J Exp Med.* 2002;195: 593–602. doi:10.1084/jem.20011500
 69. Brown DA, Rose JK. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell.* 1992;68: 533–544. doi:10.1016/0092-8674(92)90189-J
 70. Boncristiani HF, Criado MF, Arruda E. Respiratory viroses. In: Lederberg J (Ed). *Encyclopedia of Microbiology* 3rd Ed. Academic Press, New York, Elsevier Inc. p:500-518, 2009
 71. Henderson G(1), Murray J, Yeo RP. Sorting of the respiratory syncytial virus matrix protein into detergent-resistant structures is dependent on cell-surface expression of the glycoproteins. *Virology* 300(2):244-54, 2002