ANDRESSA PERES DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DA NUCLEOPROTEÍNA E
DA FOSFOPROTEÍNA DO VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL
HUMANO QUANTO A SUAS PROPRIEDADES IMUNOGÊNICAS
E DE INTERAÇÃO COM PROTEÍNAS CELULARES**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para a
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

São Paulo
2013

ANDRESSA PERES DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DA NUCLEOPROTEÍNA E
DA FOSFOPROTEÍNA DO VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICAL
HUMANO QUANTO A SUAS PROPRIEDADES IMUNOGÊNICAS
E DE INTERAÇÃO COM PROTEÍNAS CELULARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Armando Morais Ventura

Co-Orientador: Dr. Jean-François Eléouët

Versão original

São Paulo
2013

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

reprodução não autorizada pelo autor

Oliveira, Andressa Peres.

Caracterização da nucleoproteína e da fosfoproteína do vírus respiratório sincicial humano quanto a suas propriedades imunogênicas e de interação com proteínas celulares / Andressa Peres Oliveira. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Armando Morais Ventura.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Virologia molecular.

Versão do título para o inglês: Characterization of human respiratory syncytial virus nucleoprotein and phosphoprotein immunogenic properties and interactions with cell proteins.

1. Vírus respiratório sincicial humano 2. Interação vírus-célula
3. Nucleoproteína 4. Imunização I. Ventura, Prof. Dr. Armando Morais
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0138/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Andressa Peres Oliveira.

Título da Tese: Caracterização da nucleoproteína e da fosfoproteína do vírus respiratório sincicial humano quanto a suas propriedades imunogênicas e de interação com proteínas celulares.

Orientador(a): Prof. Dr. Armando Morais Ventura.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **063** nas fls. **104** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Armando Moraes Ventura**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*Caracterização funcional da nucleoproteína e da fosfoproteína do vírus respiratório sincicial humano*" do qual participam o(s) alunos **Andressa Peres de Oliveira**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **17.05.2011**, com validade de **3 anos**.

São Paulo, 23 de maio de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

À minha mãe

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua presença constante na minha vida e pelo auxílio nas minhas escolhas.

Ao mestre Jesus, pelas bênçãos, pelos ensinamentos e pelo amparo em todos os momentos.

Agradeço à minha mãe, pelo amor, carinho e apoio incondicional. Por sempre ter acreditado em mim e por sempre me incentivar. Seus ensinamentos foram essenciais na minha vida. Obrigada mãe!

Ao meu pai pelo suporte, incentivo e compreensão. Obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Armando Moraes Ventura, por ter me aceitado no seu laboratório, pela oportunidade da realização desse trabalho e pela sua orientação. Agradeço pelos conhecimentos e por me auxiliar em todos os experimentos, relatórios, entre outros.

Agradeço ao meu grande amigo Paulo Ribeiro, pela ajuda e apoio em todos os momentos, “May the Force be with you”.

A Fabiana pela cooperação, apoio e amizade.

Aos amigos de laboratório, Cassiano, Fernando, Tamura, Luis, Yordanka, Valdino, Angel, Lucas, Marcelo, Juliana, Thiago e Francisco agradeço pela convivência e pelas contribuições no desenvolvimento desse trabalho.

A Profª Drª Nídia Alice Pinheiro e Samara, obrigada pela amizade e ajuda.

Ao Dr. Jean-François Éleouët, por ter me recebido em seu laboratório, pelo suporte em todo instante durante o estágio na França, pelo incentivo e por toda sua paciência. Merci Beaucoup!

A Drª Marie Galloux, pela ajuda incondicional em todos os experimentos, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos amigos de laboratório do INRA: Gaëlle, Julien, Jenna, Cassie, Marie-Lise, Marie-Anne, Charles-Adrien, Vincent, Bruno, Alix, Guy, Drª Sabine, Drª Christina Sizun e Dr. Bernard por terem me recebido com tanto carinho e por toda ajuda durante o estágio na França.

Ao Prof. Dr. Júlio Cezar Franco de Oliveira, por ter me ensinado os primeiros passos na carreira científica. Um grande amigo para todo sempre. Obrigada Júlio!

Aos meus queridos amigos Victor e Dani, muito obrigada pelo apoio e colaboração nos experimentos.

A todos do laboratório do Prof. Dr. Carlos Menck, da Profª Drª Rita de Cássia e do Prof. Dr. Luis Carlos pela convivência e empréstimos de equipamentos.

Ao pessoal da biblioteca, da secretaria, aos seguranças e o pessoal da limpeza, muito obrigada.

À Fapesp pela bolsa concedida e pelos benefícios.

À Universidade de São Paulo e às agências financiadoras CAPES, CNPq pelo apoio financeiro.

Obrigada a todos!

RESUMO

Oliveira AP. Caracterização da nucleoproteína e da fosfoproteína do Vírus Respiratório Sincicial Humano quanto a suas propriedades imunogênicas e de interação com proteínas celulares. [tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

O Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) é um dos patógenos mais importantes do trato respiratório, causando doença respiratória principalmente em recém-nascidos, bebês, crianças e pacientes imunocomprometidos. Até o presente não há vacina aprovada para prevenir contra sua infecção. O genoma do HRSV codifica onze proteínas, sendo fundamental para entender a sua relação com o hospedeiro, caracterizar as interações entre essas proteínas e componentes celulares. Analisamos as interações das proteínas virais nucleoproteína (N), fosfoproteína (P) e matriz (M) com proteínas celulares, tanto pela expressão individual dessas proteínas virais transfectando vetores plasmidiais, quanto no contexto da infecção, em células HEK-293T. Verificamos que N interage com as proteínas celulares Hsp70, PRMT5 e WDR77; P interage com Hsp70 e com Tropomiosina; e M com Nucleofosmina e Tropomiosina. Os genes dessas proteínas humanas foram otimizados para expressão em bactérias, e utilizados numa estratégia de co-expressão com um gene viral. No caso de haver interação a proteína parceira é co-precipitada. Após um trabalho inicial de avaliação, optamos por concentrar a análise na interação da Hsp70 com as proteínas N e P, e os dados obtidos indicam que em extratos de bactérias essas interações também são observadas. Utilizando um conjunto de proteínas N e P mutantes, esse sistema permitiu definir que o amino terminal de N interage com Hsp70, e que o carboxi e o amino terminal de P interagem com Hsp70. Foram construídos vetores com os domínios amino ou carboxi terminais de Hsp70 e feitos ensaios de interação com o amino terminal de N. O dado obtido indica que a interação é mais forte com o domínio amino terminal de Hsp70. Foi também utilizado um inibidor de proteínas de choque térmico, a quercetina, para obter evidências da interferência de Hsp70 com o processo de replicação utilizando o ensaio de minigenoma. Esses dados não foram conclusivos. No entanto, a superexpressão de Hsp70 por transfecção indica um efeito de estímulo de Hsp70 sobre a replicação de HRSV, utilizando esse mesmo ensaio. Nesses experimentos o tamanho e a quantidade de corpúsculos de inclusão foram monitorados, indicando que a superexpressão de Hsp70 os torna menores e mais numerosos, o que é compatível com o estímulo à replicação observado. Aproveitando as ferramentas de expressão para estudar as proteínas virais, seu potencial imunogênico também pode ser explorado. Assim, outro objetivo desse trabalho foi avaliar N e P como imunógenos em camundongos Balb/c. Foram feitas imunizações com vacinas de DNA (pShuttleNopt e pShuttlePopt) ou com proteínas (MBP-N e MBP-P). Os resultados mostraram que as vacinas de DNA, foram capazes de induzir resposta celular e humoral, e as proteínas majoritariamente resposta humoral. Num ensaio de desafio com o vírus, foi possível detectar redução da carga viral significativa nos grupos imunizados com pShuttleNopt e com a proteína de fusão MBP-N. Este dado indica o potencial de desenvolvimento de uma formulação vacinal contendo N.

Palavras-chave: Vírus respiratório sincicial humano. Interação vírus-célula. Nucleoproteína. Imunização.

ABSTRACT

Oliveira AP. Characterization of Human Respiratory Syncytial Virus nucleoprotein and phosphoprotein immunogenic properties and interactions with cell proteins. [Ph. D. thesis (Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Human respiratory syncytial virus (HRSV) is one of the most important pathogens of the respiratory tract and causes respiratory disease in newborns, babies, children and immunocompromised patients. Up to the present there is no vaccine approved for prevention against its infection. The genome of HRSV encodes eleven proteins and to understand virus relationship with the host is critical to characterize the interactions between these proteins and components of the infected cell. We analyzed the interactions of viral nucleoprotein (N), phosphoprotein (P) and matrix protein (M) with cellular proteins. This was done by the individual expression of these viral proteins by transfection of plasmid vectors, or in the context of infection, both in HEK-293T cells. N interacts with the cellular proteins Hsp70, PRMT5 and WDR77; P with Hsp70 and Tropomyosin; and M with Nucleophosmin and Tropomyosin. The genes of these human proteins were optimized for expression in bacteria and we used the strategy of co-expression of a viral gene and a cell gene. If there is co-precipitation of a partner protein we can say that there is interaction. After an initial evaluation we chose to focus the analysis on the interaction of Hsp70 with N and P proteins. The data obtained indicate that these interactions also occur in bacterial extracts. Using a set of N and P protein mutants the results obtained indicate that the N amino terminus, and the P carboxy and amino terminus, interact with Hsp70. Hsp70 amino and carboxi terminal domains were cloned apart in bacterial expression vectors and used for interaction tests with N protein amino terminal region. The data obtained indicates that the interaction is stronger with the amino terminal domain of Hsp70. We also used the heat shock protein inhibitor quercetin to obtain evidence of Hsp70 interference with the virus replication using the minigenome test. These data were not conclusive. However, the overexpression of Hsp70 by transfection resulted in stimulation effect on minigenome replication. In these experiments the size and amount of inclusion bodies were monitored, indicating that overexpression of Hsp70 makes them smaller and more numerous, which is compatible with the replication stimulus. Taking advantage of the expression tools to study viral proteins, immunogenic potential can also be exploited. In this sense another objective of this work was to assess N and P as antigens in Balb/c mice. Immunizations were made with DNA vaccines (pShuttleNopt and pShuttlePopt) or with proteins (MBP-N and MBP-P). The results showed that DNA vaccines were capable of inducing humoral and cellular response and proteins mainly humoral response. In a challenge assay with the virus, it was possible to detect significant virus titer reduction in groups immunized with pShuttleNopt and with the MBP-N fusion protein. This indicates a potential for development of a vaccine formulation containing N.

Keywords: Human respiratory syncytial virus. Virus-cell interaction. Nucleoprotein. Immunization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cultura de células HEp-2 infectadas com o HRSV, cepa A2.....	21
Figura 2 - Esquema da partícula viral do HRSV	22
Figura 3 - Proteínas e genoma do HRSV	23
Figura 4 - Ciclo de replicação do HRSV.....	24
Figura 5 - Estrutura do complexo de N-RNA decamérico	33
Figura 6 - Estrutura em 3D da proteína N.	34
Figura 7 - Tetrâmero de P.	35
Figura 8 - Representação esquemática da organização Hsp70 humana.....	37
Figura 9 - Estrutura do complexo PRMT-5-MEP50 humano	40
Figura 10 - Cristalografia da Tropomiosina	41
Figura 11 - Mapa do vector pET28a. Novagen	47
Figura 12 - Mapa do vector pGex-4T-3. GE Healthcare.....	47
Figura 13 - Mapa do vetor pcDNA3.1. Invitrogen TM	48
Quadro 1 - Oligonucleotídeos usados nas construções de Hsp70.....	49
Quadro 2 - Oligonucleotídeos para detecção do gene N por <i>Real Time</i> qPCR.....	62
Figura 14 - Co-imunoprecipitação da proteína Hsp70	63
Figura 15 - Co-imunoprecipitação da proteína NPM.....	64
Figura 16 - Co-imunoprecipitação da proteína WDR77	64
Figura 17 - Co-imunoprecipitação da proteína PRMT-5	65
Figura 18 - Co-imunoprecipitação da proteína TPM	65
Figura 19 - Co-imunoprecipitação das proteínas virais N e P.....	66
Figura 20 - Co-imunoprecipitação da proteína viral M.....	66
Figura 21 - Co-imunoprecipitação da proteína N.....	67
Figura 22 - Co-imunoprecipitação da proteína M	67
Figura 23 - Co-imunoprecipitação da proteína N com Hsp70	68
Figura 24 - Co-imunoprecipitação da proteína P com Hsp70	69
Figura 25 - Co-imunoprecipitação da proteína M com Hsp70.....	69
Figura 26 - Co-imunoprecipitação da proteína M com NPM.....	70
Figura 27 - Co-imunoprecipitação da proteína N com WDR77	70
Figura 28 - Co-imunoprecipitação da proteína M com TPM.....	71
Figura 29 - Co-imunoprecipitação da proteína P com TPM	71

Figura 30 - Co-imunoprecipitação da proteína PRMT-5	72
Figura 31 - Esquema do vetor pET 28 a+ Hsp70	74
Figura 32 - Esquema do vetor pGex-Hsp70.....	74
Figura 33 - Esquema do vetor pcDNA 3 Hsp70	74
Figura 34 - Purificação de proteínas celulares em fusão com GST	76
Figura 35 - Detecção da interação entre a proteína TM e P ou M.....	77
Figura 36 - Detecção da interação entre a proteína Hsp70 e a proteína N	78
Figura 37 - A proteína N não interage com GST	79
Figura 38 - Detecção da interação entre a proteína Hsp70 e a proteína P.....	80
Figura 39 - A proteína P não interage com GST	81
Figura 40 - Gráfico de gel-filtração da proteína Hsp70 após incubação com ATP	82
Figura 41 - Análise da gel filtração da proteína Hsp70 após incubação com ATP.....	83
Figura 42 - Gráfico de gel filtração da proteína Hsp70 após incubação com ADP	83
Figura 43 - Análise da Gel-Filtração da proteína Hsp70 após incubação com ADP	84
Figura 44 - Gráfico de gel filtração da proteína Hsp70.....	84
Figura 45 - Análise da Gel-Filtração da proteína Hsp70.....	85
Figura 46 - Interação entre N _{NTD} e Hsp70	86
Figura 47 - Interação da proteína Hsp70 com His-N	87
Figura 48 - Interação da proteína Hsp70 com His-N _{NTD}	87
Figura 49 - Interação da proteína Hsp70 com His-N°	88
Figura 50 - Interação da proteína Hsp70 com His-M e His-M2.1.....	88
Figura 51 - Esquema dos vetores pET 28 a+ Hsp70 N terminal e C terminal	89
Figura 52 - Esquema dos vetores pGex-Hsp70 N terminal e C terminal	90
Figura 53 - Expressão das proteínas Hsp70 N e C terminal.....	90
Figura 54 - Interação dos domínios amino ou carboxi terminais da proteína Hsp70 com N _{NTD}	91
Figura 55 - Efeito de quercetina sobre a atividade do minigenoma.....	93
Figura 56 - Análise da expressão das proteínas Hsp70 e N após tratamento com quercetina.....	94
Figura 57 - Efeito de quercetina e superexpressão de Hsp70 sobre os corpúsculos de inclusão	95
Figura 58 - Efeito da superexpressão de Hsp70 sobre a atividade do minigenoma.....	96
Figura 59 - Efeito da superexpressão de Hsp70 sobre os corpúsculos de inclusão.....	97

Figura 60 - Efeito da superexpressão de Hsp70 sobre a atividade do minigenoma.....	98
Figura 61 - Análise da expressão das proteínas Hsp70, Tubulina, N, P e M2.1	98
Figura 62 - Co-localização e efeito da superexpressão de Hsp70 sobre os corpúsculos de inclusão	100
Figura 63 - Efeito da superexpressão de Hsp70 sobre o tamanho dos corpúsculos de inclusão	101
Figura 64 - Cinética do efeito de superexpressão de Hsp70 na atividade do minigenoma	102
Figura 65 - Esquema de imunização com DNA.....	103
Figura 66 - Resposta celular em animais imunizados com DNA.....	104
Figura 67 - Resposta humoral em animais imunizados com pShuttleNopt.....	105
Figura 68 - Resposta humoral em animais imunizados com pShuttlePopt	106
Figura 69 - Resposta humoral em animais imunizados com pShuttle.....	108
Figura 70 - Esquema do experimento de imunização seguido de desafio com HRSV	109
Figura 71 - Resposta humoral em animais imunizados com as proteínas de fusão	109
Figura 72 - Carga viral após imunização com DNA e proteína de fusão seguida de desafio	111
Figura 73 - Esquema do experimento de imunização seguido de desafio com HRSV	112
Figura 74 - Resposta humoral em animais imunizados com pShuttleNopt, pShuttlePopt e pShuttle.....	112
Figura 75 - Resposta humoral em animais imunizados com MBP-N e MBP-P	114
Figura 76 - Carga viral após imunização com DNA e proteína de fusão seguida de desafio	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tabela 1. Identificação das proteínas co-imunoprecipitadas por espectrometria de massas	30
Tabela 2 - Efeitos histopatológicos	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATPase - adenilpirofosfatase
B23 - nucleofosmina
BDV - *Borna Disease Virus*
BSA - Albumina bovina
CAI - *codon adaptation index*
cDNA - DNA complementar
CX3C - fractalcina
DAB - 3,3'-diaminobenzidina
DEPC – Dicarbonato Dietila
DTT - *DL-Dithiothreitol*
DC - células dendríticas
DNA - ácido desoxirribonucleico
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
ELISA - *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
ELISPOT- *Enzyme-Linked ImmunoSpot*
FI-HRSV - Vacina contra HRSV inativada com formalina
GST - *Glutathione S-transferase*
h - Hora
HSPs - Proteínas celulares do choque térmico
Hsc70 - *Heat shock cognate protein 70*
Hsp40 - *Heat shock protein 40*
Hsp70 - *Heat shock protein 70*
Hsp73 - *Heat shock protein 73*
ICTV - *International Committee on Taxonomy of Viruses*
IPTG - Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo
LB – Luria-Bertani
MBP - *Maltose-Binding Protein*
Mep50 - *methylosome protein 50*
Min - minuto
mRNAs - RNA mensageiro
NBD - domínio de ligação com nucleotídeos

N_{CTD} – Domínio globular do C-terminal
N_{NTD} - Domínio globular do N-terminal
NPM – nucleofosmina
ONPG - *o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside*
OPD - ortophenilendiamina
PBD - domínio de ligação a peptídeos
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
P_{CTD} - C-terminal de P
PEI - *polyethyleneimine*
Pfu – unidade formadora de placa
PRMT5- Proteína arginina metil transferase-5
PRMT - Proteína arginina metil transferase
qPCR- *Quantitative Polymerase Chain Reaction*
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
RNA - Ácido Ribonucléico
RNApol II - RNA polimerase II
Rpm - rotações por minuto
RT- Transcriptase Reversa
SBD - domínio de ligação com substratos
siRNA - *small interfering RNA*
SV40 - *Simian vacuolating virus 40*
TCD4 - Linfócito *Helper*
TCD8 - Linfócito Citotóxico
Th1 - T helper 1
Th2 - T helper 2
T.A. – Temperatura ambiente
TM - tropomiosina
VSV - *Vesicular Stomatitis Virus*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 O Vírus Respiratório Sincicial Humano.....	21
1.2 Estrutura e Genoma Viral	22
1.3 Ciclo Replicativo	24
1.4 Epidemiologia	25
1.5 Patogênese	25
1.6 Imunidade	26
<i>1.6.1 Resposta Inata.....</i>	<i>26</i>
<i>1.6.2 Resposta Celular.....</i>	<i>27</i>
<i>1.6.3 Resposta Humoral</i>	<i>27</i>
1.7 Vacinas.....	27
1.8 Tratamento	28
<i>1.8.1 Anticorpos</i>	<i>28</i>
<i>1.8.2 Antivirais.....</i>	<i>28</i>
1.9 Dados anteriores do laboratório.....	29
1.10 Proteínas virais e celulares abordadas neste estudo.....	32
<i>1.10.1 Proteína M</i>	<i>32</i>
<i>1.10.2 Proteína N</i>	<i>32</i>
<i>1.10.3 Proteína P</i>	<i>34</i>
<i>1.10.4 Interação entre a proteína N e P</i>	<i>35</i>
<i>1.10.5 Proteínas de choque térmico</i>	<i>36</i>
<u><i>1.10.5.1 Hsp70</i></u>	<u><i>36</i></u>
<u><i>1.10.5.2 Hsp40</i></u>	<u><i>37</i></u>
<u><i>1.10.5.3 Interação entre Hsp70 e Hsp40</i></u>	<u><i>37</i></u>
<i>1.10.6 NPM</i>	<i>38</i>
<i>1.10.7 PRMT5.....</i>	<i>38</i>
<i>1.10.8 WDR77.....</i>	<i>39</i>
<i>1.10.9 Interação entre PRMT-5 e WDR77</i>	<i>40</i>
<i>1.10.10 Tropomiosina.....</i>	<i>40</i>
2 OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo geral.....	42

2.2 Objetivos específicos.....	42
2.2.1 Interação das proteínas virais com as proteínas celulares	42
2.2.1 Testes de imunização	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Células e vírus	43
3.2 Plasmídeos	43
3.3 Bactérias	43
3.4 Transformação de bactérias por eletroporação e plaqueamento.....	44
3.5 Extração e purificação de DNA plasmidial	44
3.6 Transfecção de células de mamíferos.....	44
3.7 Western Blotting	45
3.8. Imunoprecipitação.....	45
3.9 Material e Métodos utilizados durante o estágio no INRA- França	46
3.9.1 Plasmídeos	46
3.9.2 Oligonucleotídeos para construções de Hsp70.....	48
3.9.3 Clonagem dos genes das proteínas celulares HSP70, Tropomiosina, Nucleofosmina, WDR77 e PRMT-5.....	49
3.9.4 Purificação dos fragmentos de DNA com os genes celulares.....	49
3.9.5 Ligação do DNA dos genes celulares com os plasmídeos	50
3.9.6 Transformação das bactérias quimio-competentes	50
3.9.7 Análise dos clones.....	50
3.9.8 Expressão das proteínas celulares Hsp70, PRMT-5, WDR77, TM e NPM	51
3.9.9 Purificação das proteínas GST-Hsp70, GST-WDR77, GST-PRMT-5, GST-TM e GST-NPM (clonagem em pGEx-4T-3)	51
3.9.10 Purificação das proteínas His-Hsp70, His-WDR77, His-PRMT-5, His-TM e His-NPM (clonagem em pET-28a)	52
3.9.11 Co-expressão das proteínas virais com as proteínas celulares	52
3.9.12 Clivagem da proteína de fusão GST utilizando a enzima trombina.....	52
3.9.13 Gel filtração	53
3.9.14 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	53
3.9.15 Obtenção dos clones de Hsp70 N-terminal por mutagênese sítio dirigida.....	53
3.9.16 Células.....	54
3.9.17 Minigenoma.....	55

3.9.18 Western Blotting	55
3.9.19 Imunofluorescência.....	56
3.9.20 Quantificação da atividade da polimerase viral através da atividade da <i>Luciferase/ βgal</i>	57
3.10 Ensaios de Imunização	57
3.10.1 Expressão e purificação das proteínas MBP-N, MBP-P e MBP.....	57
3.10.2 Imunização e coleta de soro dos camundongos	58
3.10.3 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)	58
3.10.4 ELISPOT (Enzyme-linked immunosorbent spot)	59
3.10.5 Produção, purificação e titulação do HRSV	60
3.10.6 Desafio com HRSV.....	61
3.10.7 Extração de RNA e Real Time qPCR para quantificação de HRSV.....	61
3.10.8 Histologia.....	62
4 RESULTADOS	63
4.1 Interação entre proteínas celulares e proteínas virais expressas por transfecção.....	63
4.1.1 Co-imunoprecipitação de proteínas celulares com proteínas virais.....	63
4.1.2 Co-imunoprecipitação de proteínas virais com proteínas celulares.....	65
4.2 Interação entre proteínas celulares e proteínas virais expressas por infecção	68
4.3 Associação entre as proteínas celulares WDR77 e PRMT5 em células HEK293	71
4.4 Definição de qual gene selecionar para estudo detalhado de interação	72
4.4.1 Clonagem dos genes celulares em vetores de expressão	73
4.4.2 Expressão e purificação de proteínas celulares em fusão com GST.....	75
4.4.3 Estudo das Interações por co-expressão em bactérias entre tropomiosina e as proteínas virais P ou M.....	76
4.5 Estudo das Interações por co-expressão em bactérias entre Hsp70 e N ou P	77
4.5.1 Co-expressão das proteínas Hsp70 e N e purificação com GS-beads	77
4.5.2 Co-expressão das proteínas Hsp70 e P e purificação com GS-beads.....	79
4.6 Estudo das Interações in vitro entre Hsp70 e proteínas virais.....	81
4.6.1 Purificação da proteína Hsp70 utilizando a técnica de Gel-Filtração.....	81
4.6.2 Análise da interação entre Hsp70 e o amino terminal de N por RMN.....	85
4.6.3 Interação da proteína Hsp70 purificada com as proteínas virais N, N _{NTD} , N ^o , M2-1 e M.....	86
4.7 Estudo da participação dos domínios da Hsp70 nas interações.....	89

4.7.1 Construções dos plasmídeos Hsp70 N-terminal e C-terminal separadamente	89
4.7.2 Co-expressão de GST-Hsp70 N-terminal e GST-Hsp70 C-terminal com <i>His-N_{NTD}</i> em bactérias	91
4.8 Interferência de Hsp70 na funcionalidade do Minigenoma viral e na formação de corpúsculos de inclusão.....	91
4.8.1 Efeito de quercetina na atividade do Minigenoma.....	92
4.8.2 Efeito de quercetina e de superexpressão de Hsp70 na formação de corpúsculos de inclusão.....	94
4.8.3 Efeito de superexpressão de Hsp70 na atividade do Minigenoma	96
4.8.4 Efeito de superexpressão de Hsp70 na atividade do minigenoma monitorando Hsp70 endógena	97
4.8.5 Cinética do efeito de superexpressão de Hsp70 na atividade do minigenoma.....	101
4.9 Testes de imunização	102
4.9.1 Imunização com DNA	103
4.9.2 Imunização seguida de desafio com HRSV.....	108
5 DISCUSSÃO	116
5.1 Interações entre proteínas celulares e proteínas virais expressas por transfecção .	116
5.2 Interações entre proteínas celulares e proteínas virais no contexto da infecção	117
5.3 Significado das interações	118
5.3.1 Interação da Hsp70 com HRSV e outros vírus	118
5.3.2 Interação entre a proteína celular NPM e a proteína viral M	120
5.3.3 Interação entre as proteínas PRMT5-WDR77 e a proteína viral N	121
5.3.4 Interação entre a proteína celular TM com as proteínas virais M e P.....	121
5.4 Abordagens em bactérias e <i>in vitro</i> para estudo das interações	122
5.5 Detalhamento da interação entre Hsp70 e as proteínas N e P.....	123
5.5.1 Estudo das Interações por co-expressão em bactérias entre Hsp70 e N ou P.....	123
5.5.2 Estudo das Interações <i>in vitro</i> entre Hsp70 e proteínas virais	124
5.5.3 Estudo participação dos domínios da Hsp70 nas interações	126
5.6 Interferência de Hsp70 no Minigenoma e corpúsculos de inclusão	126
5.7 Experimentos de Imunização DNA e com proteínas.....	128
6 CONCLUSÕES	132
6.1 Interação das proteínas virais com as proteínas celulares.....	132
6.2 Ensaios de Imunização com as proteínas N e P	133

REFERÊNCIAS	134
APÊNDICE - Artigo.....	149
ANEXO - Curriculum vitae.....	158

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Vírus Respiratório Sincicial Humano

Originalmente o Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) foi isolado em 1956 de chimpanzés que apresentavam sintomatologia semelhante ao resfriado comum (Blount et al., 1956). Seu isolamento em humanos se deu em 1957 (Chanock et al., 1957).

O HRSV pertence à ordem *Mononegavirales*, que contém vírus com genoma de RNA de fita simples não segmentado e polaridade negativa. Encontra-se dentro da família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae*, gênero *Pneumovirus*, segundo as normas do *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV). O nome do HRSV é derivado de sua capacidade de formação de sincícios em cultura celular (Figura 1), onde células maiores e multinucleadas são decorrentes da fusão de células adjacentes (Collins et al., 2001).

Figura 1- Cultura de células HEp-2 infectadas com o HRSV, cepa A2.

Um sincício, efeito citopático característico do vírus, está circundado em vermelho. Coloração por hematoxilina-eosina.

Fonte: Simabuco (2009).

Os isolados de HRSV são classificados em dois grupos antigênicos (A e B), segregados segundo ensaios de neutralização *in vitro* e reações com anticorpos monoclonais (Anderson et al., 1985; Mufson et al., 1985). A grande diferença os grupos A e B se dá na proteína G (Johnson et al., 1987), descrita adiante. A caracterização da variabilidade genética

e evolução molecular da proteína G indica a separação dos HRSV A e B 350 anos atrás a partir de um ancestral comum (Zlateva et al., 2005).

1.2 Estrutura e Genoma Viral

O HRSV esquematizado à figura 2 é um vírus envelopado cujo genoma consiste em uma fita simples de RNA não segmentada e com polaridade negativa. O genoma (esquematizado à figura 3b) contém 15.222 nucleotídeos (cepa A2) e 10 genes que codificam 11 proteínas: NS1 e NS2 (não estruturais), N (nucleocapsídeo), P (fosfoproteína), M (matriz), SH (pequena proteína hidrofóbica), G (anti-receptor), F (fusão), M2-1 e M2-2 (regulação da transcrição e replicação) e L (principal subunidade da polimerase) (Collins et al., 2001).

Figura 2- Esquema da partícula viral do HRSV.

Fonte: Rega Institute for Medical Research (2013).

O envelope é uma bicamada lipídica obtida da membrana da célula hospedeira, onde se encontram três glicoproteínas transmembrânicas: G, F e SH. Além disso, existe uma matriz proteica na superfície interna do envelope, formada pela proteína M (Collins et al., 2001). Quando visualizados em microscópio eletrônico, os vírions aparecem como esferas pleomórficas de 150 a 300 nm de diâmetro (figura 3a). Em células polarizadas, o brotamento se dá na membrana apical (Roberts et al., 1995). A microscopia eletrônica revela também que os nucleocapsídeos têm forma de filamentos e de estruturas menores em forma de anel, decorrentes da quebra desses filamentos, ambos com diâmetros de 14 a 16 nm (Bhella et al., 2002; Meric et al., 1994; Murphy et al., 2003).

O complexo ribonucleoprotéico encontrado no vírion de HRSV é formado pela molécula de RNA genômico associada com as proteínas N, P e L. A nucleoproteína (N) é a mais abundante, interage fortemente com o RNA e tem a função de estabilizá-lo (Collins et al., 2001). As outras proteínas que constituem o nucleocapsídeo, a fosfoproteína (P) e a “large” (L) correspondem às subunidades da polimerase viral, sendo que L é a que contém o sítio ativo de polimerização e P age como uma espécie de fator de transcrição (Stec et al., 1991).

Figura 3 - Proteínas e genoma do HRSV.

(A) O painel superior mostra uma micrografia eletrônica em que partículas de HRSV estão brotando de uma célula: V indica um vírus brotando e F indica estruturas filamentosas intracitoplasmáticas. (B) Esquema do genoma indicando o tamanho das proteínas acima (aa) e dos genes abaixo (nt).

Fonte: Collins e Melero (2011).

1.3 Ciclo Replicativo

Tal como para os demais membros da família Paramyxoviridae, os processos de transcrição e replicação do genoma ocorrem inteiramente no citoplasma, sem aparente envolvimento nuclear (figura 4). A infecção pelo HRSV resulta na formação de corpúsculos de inclusão citoplasmáticos, tendo sido neles demonstrada a presença das proteínas N, P, M2-1 (Garcia et al., 1993; Simabuco et al., 2009) e L (Carromeu et al., 2007), sugerindo que nessas estruturas há concentração dessas proteínas e intensa replicação e transcrição viral. A infecção se inicia com a ligação da glicoproteína G em um receptor da célula hospedeira, possivelmente uma glicosaminoglicana (Feldman et al., 1999). Em seguida, a proteína F media a fusão das membranas viral e celular, permitindo a liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma (Collins et al., 2001). O processo de transcrição dos mRNAs é então realizado no citoplasma pela RNA polimerase dependente de RNA do vírus, usando como molde o RNA de polaridade negativa do genoma (Collins et al., 2001).

Figura 4 – Ciclo de replicação do HRSV.

Fonte: Éleouët (2012) modificado.

1.4 Epidemiologia

O HRSV é altamente contagioso e pode infectar um indivíduo várias vezes ao longo da vida. Os seres humanos são o único hospedeiro natural para o HRSV, embora o vírus possa facilmente infectar e causar doença grave em primatas não humanos (Kondgen et al., 2008). As infecções ocorrem principalmente em surtos epidêmicos anuais durante os meses de inverno em países de clima temperado ou durante a estação chuvosa em países tropicais (Durigon et al., 1999). A maioria das crianças é infectada pelo HRSV durante o primeiro ano de vida, e a reinfecção é frequente durante os primeiros anos de vida (Glezen et al., 1986). Vários genótipos dentro dos grupos A e B podem circular dentro na mesma comunidade, com um ou dois genótipos dominantes sendo predominantes em anos sucessivos (Cane, 2001). Essas diferenças entre genótipos explicam em grande parte porque ocorrem reinfecções pelo HRSV.

Estima-se que globalmente o HRSV causou quase 34 milhões de casos em crianças menores de 5 anos de idade, em 2005, 10% deles requerendo hospitalização (Nair et al., 2010). Isto resultou em um número estimado de 66.000-199.000 mortes, com 99% dessas mortes ocorrendo em países em desenvolvimento, refletindo uma maior população de lactentes e crianças jovens sob risco (Collins, Melero, 2011).

1.5 Patogênese

O HRSV é o mais importante causador de doença respiratória severa em recém-nascidos, bebês e crianças, além de pacientes imunocomprometidos e idosos (Falsey, Walsh, 2000). A infecção por HRSV pode estar associada à asma (Lemanske, 2004) e à co-infecção bacteriana do trato respiratório (Thorburn et al., 2006). Manifestações da doença durante a infecção primária pelo HRSV podem variar muito entre os indivíduos, incluindo congestão nasal, tosse, falta de ar, febre bronqueolite e pneumonia (Collins, Graham, 2008).

O risco de doença grave por infecção com o HRSV é aumentado por fatores que comprometem a capacidade de controlar e resistir a uma infecção do trato respiratório: idade (menos de 6 meses), parto prematuro (35 semanas de gestação), displasia bronco pulmonar, doença cardíaca congênita, imunodeficiência ou imunossupressão, a infecção primária ou secundária pelo vírus, vias aéreas irregularmente estreitas, baixo peso ao nascer, sexo masculino, um baixo título de anticorpos contra o vírus, e fragilidade durante a velhice (Collins, Graham, 2008).

Vários estudos sugerem que o HRSV do grupo A está mais associado à doença severa, no entanto, esse ainda não é um ponto totalmente consensual (Collins, Melero, 2011; Smyth et al., 2002; Tabarani et al., 2013). Postula-se também que há uma associação positiva entre o nível de replicação do vírus e a gravidade da doença (DeVincenzo et al., 2010). Além disso, o fato de o vírus multiplicar-se na camada superficial do epitélio respiratório pode retardar e reduzir a exposição do antígeno viral ao sistema imunitário do hospedeiro. Foi observado também que no modelo de infecção em camundongos parte da resposta celular (TCD8) contra o HRSV está bloqueada no epitélio pulmonar (DiNapoli et al., 2008), sendo que fenômeno similar poderia estar ocorrendo em humanos, contribuindo para as reinfecções.

Finalmente, é importante mencionar que o estímulo de linfócitos TCD4 + a uma resposta desviada para Th2 também tem sido associado à doença causada pelo HRSV. A produção excessiva de muco, obstrução das vias aéreas, chiado e efeitos duradouros sobre a função pulmonar são manifestações que têm semelhança com a asma, que também envolve um viés de resposta de Th2 (Miyairi, DeVincenzo, 2008). Esse tipo de reação foi detectado de forma exacerbada no teste da formulação vacinal com vírus inativado por formalina, mencionado mais adiante, quando as crianças vacinadas foram infectadas por HRSV (Kim et al., 1969). No entanto, há evidências também de que pode haver contribuição da resposta Th1 para a patogênese pelo HRSV (Lee et al., 2007).

1.6 Imunidade

1.6.1 Resposta Inata

Os macrófagos têm sido reportados como a componente da imunidade inata mais importante no combate ao HRSV, atuando também na remoção de resíduos na fase tardia da infecção (Reed et al., 2008). Outros estudos em camundongos mostraram que os macrófagos proporcionam uma resposta imediata de citocinas pró-inflamatórias após a infecção pelo HRSV (Pribul et al., 2008), tendo sido caracterizado que produzem interferon do tipo I após desafio experimental com paramixovírus (Kumagai et al., 2007). Outra característica da imunidade inata, que também pode contribuir para restringir a infecção por HRSV e a sua replicação, é a presença de proteínas surfactantes (Glasser et al., 2009).

1.6.2 Resposta Celular

Após a infecção por HRSV, ocorre o recrutamento de células TCD4+ e TCD8+ ao local de infecção e a produção de IFN que estimula a diferenciação de TCD4 + e TCD8+, que contribuem para a geração e amplificação das respostas imunes humoral e celular (Olson et al., 2008; Stevens et al., 2009).

Em contrapartida, foi mostrado que existem funções do HRSV que atuam no sentido de inibir a resposta imune protetora. Estudos mostraram que a proteína NS1 do HRSV suprime parcialmente a maturação de células dendríticas humanas (DC) e diminuí a ativação de TCD4 + e TCD8 + (Munir et al., 2011). A proteína F também pode suprimir as respostas celulares por contato (Schlender et al., 2002). Outro mecanismo postulado é a presença de domínios análogos à fractalcina CX3C na proteína G, que se mostraram capazes de inibir as respostas celulares em camundongos (Harcourt et al., 2006).

1.6.3 Resposta Humoral

A proteção contra a infecção pelo HRSV é conferida principalmente por anticorpos neutralizantes. As proteínas F e G são os únicos antígenos virais capazes de induzir anticorpos neutralizantes que proporcionam proteção contra o HRSV em modelos animais (Connors et al., 1991, Stott et al., 1987). Além disso, uma correlação positiva foi encontrada entre títulos elevados de anticorpos neutralizantes no soro e a proteção de voluntários humanos contra o desafio por HRSV (Falsey, Walsh, 2000). Também já foi visto que essa relação ocorre em indivíduos com alto risco de infecção, crianças e idosos (Falsey, Walsh, 1998; Falsey, Walsh, 2000; Glezen et al., 1986).

1.7 Vacinas

Devido ao impacto socioeconômico mundial do HRSV, torna-se fundamental o estudo da resposta imune aos seus diferentes antígenos visando à prevenção da infecção. Apesar dos constantes avanços, não se conta ainda com uma vacina contra o HRSV, pois o seu desenvolvimento tem sido dificultado por vários fatores. Em relação aos bebês e recém-nascidos, um dos fatores que impede a resposta contra o HRSV é a imaturidade imunológica no início da vida que limita as respostas inata, celular e humoral (Adkins et al., 2004; Levy, 2007). Um segundo fator é a supressão da resposta humoral contra o HRSV por anticorpos

específicos provenientes da mãe (Crowe et al., 2001; Murphy et al., 1988). Além disso, os efeitos adversos da primeira vacina testada nos anos 60, em que o vírus foi inativado com formalina (FI-HRSV), retardaram testes em humanos (Kim et al., 1969).

Atualmente algumas formulações vacinais vêm sendo testadas, chegando até a testes iniciais em humanos, na tentativa de prevenir a doença causada pelo HRSV. Entre elas estão a BBG2Na, um fragmento da proteína G de HRSV (resíduos 130-230) ligada a albumina; a proteína F purificada; combinações da proteína F, G e M; nanopartículas; o vírus inativado por β -propiolactona; e vacinas atenuadas por diversos mecanismos incluindo passagens em células, mutagênese ou genética reversa (Hurwitz, 2011).

1.8 Tratamento

1.8.1 Anticorpos

Atualmente, a forma de tratamento mais efetiva da infecção pelo HRSV é o uso de um anticorpo monoclonal humanizado contra a proteína F, o MAb-palivizumab (SynagisTM; MedImmune) que inibe a entrada do vírus na célula e está no mercado desde 2004. Vários estudos, porém, mostram que o custo do Palivizumab é muito alto em relação aos benefícios que ele gera, restringindo seu uso em larga escala (Sidwell, Barnard, 2006). Apesar do alto custo, no entanto, sabe-se que a imunoprevenção sistêmica com anticorpos neutralizantes para o HRSV fornece proteção contra a doença grave em crianças (Bocchini et al., 2009) e lactentes (Boeckh et al., 2001).

1.8.2 Antivirais

A ribavirina, um análogo de nucleosídeo que interfere com a replicação tanto de vírus com genoma de RNA como de DNA, foi a primeira droga licenciada para o tratamento da infecção por HRSV em humanos. Apesar de possuir uma potente atividade contra o HRSV em cultura celular e modelos experimentais, o uso de ribavirina na clínica é agora muito limitado devido à falta de eficácia comprovada, a dificuldade de administração, além da sua toxicidade (Collins, Melero, 2011).

Durante os últimos anos vêm sendo desenvolvidas outras drogas contra o HRSV. Alguns desses inibidores têm como alvo a proteína F. Uma série de derivados de benzimidazol, mostraram interação com proteína F e foram capazes de inibir a fusão entre as

membranas viral e celular. Outros inibidores de HRSV foram descritos, por exemplo, o NMSO₃, um lipídeo sialil sulfatado, que possui a capacidade de se ligar com a proteína G, e o composto (RSV604), um benzodiazepínico, que inibe a replicação viral ligando-se à proteína N (Collins, Melero 2011).

O HRSV foi o primeiro vírus cuja inibição de replicação por interferência de RNA foi demonstrada, tendo como alvo as proteínas F e P (Bitko, Barik, 2001). Também já foi relatado que RNAs de interferência contra a proteína NS1 foram capazes de inibir a replicação de HRSV em células em cultura e *in vivo*, camundongos Balb/c (Zhang et al., 2005). A proteína N, no entanto, foi o alvo mais explorado chegando-se a ensaios clínicos em voluntários humanos, utilizando siRNA (ALN-RSV01) administrado via intranasal. Esse antiviral mostrou ter atividade protetora após desafio com HRSV (DeVincenzo et al., 2010), porém, a sua aplicação efetiva na clínica não foi estabelecida até o momento.

1.9 Dados anteriores do laboratório

O laboratório chefiado pelo Dr. Ventura adotou o HRSV como modelo de estudo tendo sido a clonagem dos genes virais o ponto de partida. Vetores de expressão em células eucariotas permitem tanto o estudo em células em cultura como experimentos de imunização por DNA em camundongos. Esses genes clonados em vetores para expressão bacteriana permitem o estudo das proteínas purificadas ou também a sua utilização para imunização. A experiência do laboratório com as tentativas de expressar os genes de HRSV em células de mamíferos, no entanto, vinha sendo frustrante até o final de 2007. Foram clonados os genes F, G, SH, M, N e P do HRSV cepa A2, em vetores de expressão eucariótica, tanto plasmídeos quanto adenovirais, e pouco sucesso foi obtido em demonstrar sua efetiva expressão em culturas celulares ou imunizando camundongos. Surgiu então a hipótese levantada por Ternette e colaboradores (Ternette et al., 2007) de que pelo fato dos genes desses vírus não sofrerem pressão evolutiva para serem expressos a partir no núcleo, muitas vezes possuem em sua sequência motivos de instabilidade de RNA, baixo conteúdo CG, sinais de poliadenilação e processamento espúrios, além de um CAI (codon adaptation index) baixo.

Naquele momento os trabalhos em desenvolvimento no laboratório abordavam os genes M, N e P, cujas sequências foram analisadas confirmando a existência de impedimentos para expressão a partir de transcrição pela RNAPol II no núcleo. A síntese desses genes com a sequência nucleotídica otimizada foi encomendada, e sua expressão eficaz em células transfectadas passou a ser obtida. A expressão efetiva dessas proteínas possibilitou um estudo

mais detalhado de seu comportamento e localização intracelular, quando expressas fora do contexto da infecção viral. Esses dados foram publicados em duas teses defendidas sob a orientação do Dr. Ventura (Simabuco, 2009; Tamura, 2009). Uma parte dos dados para os genes N e P foi publicada em periódico da área (Simabuco et al., 2009).

Com a expressão altamente eficiente dos genes M, N e P após a otimização das sequências nucleotídicas, uma abordagem em que se investiu foi a de analisar o painel de proteínas celulares que interagem com as proteínas virais. Para tanto, foram construídos vetores de expressão (pShuttle) em que o peptídeo FLAG foi fusionado a essas proteínas, gerando os vetores pShuttle M-Flag, N-Flag e P-Flag (dados não apresentados). A expressão a partir desses três vetores mostrou-se muito eficiente (não mostrado). O sistema Flag é um dos mais utilizados para imunoprecipitação de proteínas e para identificar interações proteína/proteína (Terpe, 2003).

O primeiro passo foi a transfecção dos vetores em células humanas em cultura. Anticorpos altamente eficientes contra FLAG, ligados a esferas de agarose (Sigma), foram utilizados para fazer a imunoprecipitação. A partir de SDS-PAGE foram selecionadas bandas correspondentes aos pesos moleculares esperados das proteínas P, N e M para confirmar que a imunoprecipitação foi bem-sucedida. Os fragmentos de gel com as bandas selecionadas foram submetidos aos procedimentos de análise por espectrometria de massa confirmando a identidade das três proteínas virais e de proteínas celulares interagentes, tendo sido selecionadas as com maior escore de confiabilidade, apresentadas à Tabela 1 (Oliveira et al., 2013; Simabuco, 2009; Tamura, 2009,).

Tabela 1 - Identificação das proteínas co-imunoprecipitadas por espectrometria de massas

IP/banda analisada	proteínas identificadas	espécie	ProtScore (unused)	ProtScore (total)	% Cov.	% Cov. (95)	MW (kDa)
M/3	M Protein	HRSV A2	11.5	11.5	53.9	31.6	29
M/2	Tropomyosin alpha-3 chain (TPM)	<i>Homo sapiens</i>	15.73	15.73	57.4	20.8	36
M/1	Nucleophosmin (NPM)	<i>Homo sapiens</i>	9.16	9.16	35.4	20.7	38
N/5	N Protein	HRSV A2	35.13	35.13	66.2	51.4	43

IP/banda analisada	proteínas identificadas	especie	ProtScore (unused)	ProtScore (total)	% Cov.	% Cov. (95)	MW (kDa)
N/4	Heat Shock Protein 70 (HSP70)	<i>Homo sapiens</i>	16.12	16.12	45.5	15.7	70
N/6	Methylosome protein (MEP50, WDR77)	<i>Homo sapiens</i>	9.15	9.15	48.2	16.4	42
N/7	Nucleophosmin (NPM)	<i>Homo sapiens</i>	8.08	8.08	31.9	15.6	38
P/9	P Protein	HRSV A2	69.26	69.26	98.8	71.1	33
P/8	Heat Shock Protein 70 (HSP70)	<i>Homo sapiens</i>	54.58	54.58	70.0	52.1	70

Os dados de espectrometria de massas foram comparados com o banco de dados de proteína SwissProt usando o software ProteinPilot (Applied Biosystems). ProtScore (unused) é uma medida da detecção de peptídeo relacionado exclusivamente a uma determinada proteína. ProtScore (total) é uma medida da quantidade total de detecções para uma proteína. A cobertura total (% Cov.) é a cobertura dos peptídeos com confiança mais elevada do que o limite de 95 (% Cov. 95) são apresentados.

Fonte: Oliveira et al. (2013), modificado.

Os objetivos do nosso trabalho são consequência desses achados, sendo que inicialmente procuramos consolidar as evidências dessas interações entre proteínas virais e proteínas celulares. Mais especificamente, investigamos a interação das proteínas virais N (nucleoproteína), P (fosfoproteína) e M (matrix) com as proteínas celulares Hsp70, Tropomiosina (TPM), Nucleofosmina (NPM), arginina metiltransferase (PRMT-5) e WDR77. Para isso, demos continuidade aos experimentos de co-imunoprecipitação mencionados acima. Os experimentos de interação de M foram feitos em conjunto com Paulo Ribeiro, que finalizou sua dissertação de mestrado sob a orientação do Dr. Ventura (Ribeiro, 2012). Esses resultados de interação de M estão sendo apresentados nesta tese de forma mais completa, em conjunto com os de N e P.

1.10 Proteínas virais e celulares abordadas neste estudo

1.10.1 Proteína M

A proteína de matriz (M) faz parte da estrutura interna do virion, sendo menor que as M presentes nos demais membros da família *Paramyxoviridae*. Apresenta um domínio hidrofóbico no C-terminal, que pode mediar interação com a membrana (Collins et al., 2001).

Muito do que se sabe da proteína de matriz de HRSV é por correlação com a proteína M de outros membros da família *Paramyxoviridae*. Numa cepa de vírus Sendai com uma mutação que confere termosensibilidade à proteína M, verificou-se a interrupção da produção de partículas virais em incubação a 38° C, porém sem afetar a expressão gênica. A produção viral é restaurada, no entanto, quando a proteína M é fornecida em trans, sugerindo que M tem importância na montagem da partícula viral (Kondo et al., 1993). Utilizando vetores de expressão com os genes de matriz e nucleoproteína do vírus Parainfluenza, ao transfectar células de mamíferos, verificou-se que expressa sozinha a proteína M é capaz de liberar vesículas e que em conjunto com a nucleoproteína pode liberar vesículas contendo estruturas similares a nucleocapsídeos (Coronel et al., 1999). Em trabalho posterior, constatou-se que a incorporação do nucleocapsídeo à partícula viral é mediada por interações específicas com a proteína M, sendo a região C-terminal (domínio II) de N a responsável pela interação tanto com P, quanto com M (Coronel et al., 2001).

1.10.2 Proteína N

A proteína N do HRSV é composta por 391 aminoácidos, sendo altamente conservada entre os Pneumovírus. Esta proteína interage com o RNA formando uma estrutura ribonucleoprotéica helicoidal (Bhella et al., 2002; MacLellan et al., 2007; Meric et al., 1994), e é responsável por garantir ao genoma e ao antígeno do HRSV resistência a RNAses (Collins et al., 2001). Esse complexo também protege o vírus da produção de interferons pela célula hospedeira (Coronel et al., 2001). Análises feitas com vírus da família *Paramyxoviridae* sugerem que há interação também da proteína N com a proteína M, sendo essa interação importante para a montagem do virion (Coronel et al., 2001, Murphy et al., 2003).

A estrutura cristalina do nucleocapsídeo do HRSV, que é constituído por 10 proteínas N para cada 70 nucleotídeos no RNA, foi determinada. Nesse trabalho foram resolvidos cristais

decaméricos N-RNA por difração na resolução de 3,3 Å (Figura 5). A proteína N é organizada em quatro domínios distintos. Dois domínios globulares no N e no C-terminal, designados por N_{NTD} e N_{CTD}, respectivamente, ligados através de uma região flexível, e as extensões do N e do C terminal, chamadas de N-arm e C-arm (Figura 6). O RNA se liga na interface de N_{NTD} / N_{CTD} (Figura 5). O anel formado é estabilizado pelo RNA e pelo N-arm de (resíduos 1-35) de N. Já o C-arm localizado no C-terminal, contém os resíduos de 361-391, e os últimos 12 a 20 aminoácidos apareceram de maneira desordenada no cristal. A proteína N do HRSV se revelou homóloga às do BDV (*Borna Disease Virus*) e VSV (*Vesicular Stomatitis Virus*) (Tawar et al., 2009).

Figura 5- Estrutura do complexo de N-RNA decamérico.

A subunidade N está colorida em amarelo e em vermelho que indicam NTD e CTD, respectivamente. Os braços do N e do C terminal estão em azul. O RNA é exibido com o *backbone* em ciano e as bases em preto.

Fonte: Tawar et al. (2009).

Figura 6 - Estrutura em 3D da proteína N.

Fonte: Galloux et al. (2012).

1.10.3 Proteína P

A proteína P é composta por 241 aminoácidos e chamada de fosfoproteína por ser fosforilada nas serinas das posições 116, 117, 119, 232 e 237 (Navarro et al., 1991). Essas fosforilações são atribuídas a quinases celulares (Mazumder, Barik, 1995) e 80% ocorrem na posição 232 (Sanchez-Seco et al., 1995). A proteína P impede que proteína N se ligue a RNAs celulares garantindo a especificidade do encapsidamento do RNA viral, sendo que nesse processo é atribuída a P uma atividade de chaperona (Curran et al., 1995; Spehner et al., 1997). Na síntese de RNA, pela RNA polimerase RNA dependente codificada pelo gene L, a proteína P também funciona como um cofator. Juntas, essas 3 proteínas são requeridas para a replicação do genoma, tendo sido mostrado que a proteína P interage com as proteínas N e L (Garcia-Barreno et al., 1993; Khattar et al., 2001).

A proteína P dos vírus pertencentes à subfamília *Pneumovirinae*, na qual se inclui o HRSV, tem em torno da metade do tamanho das proteínas P dos demais membros da subfamília *Paramyxovirinae*, porém observam-se módulos estruturados e não estruturados em todas (Karlin et al., 2003). A estrutura da região dos aminoácidos 104 a 161 da proteína P do HRSV foi caracterizada mostrando que contem alfa-hélices (Figura 7), além de ser o domínio responsável pela sua oligomerização (Llorente et al., 2006; Llorente et al., 2008).

Figura 7 - Tetrâmero de P.

Está apresentada representação da interação entre os domínios de oligomerização da proteína P do HRSV. São mostrados 4 domínios em diferentes cores interagindo e formando tetrâmeros.

Fonte: Llorente et al. (2008).

1.10.4 Interação entre a proteína N e P

Acredita-se que a atividade de chaperona da proteína P impede que a proteína N se ligue a qualquer RNA sintetizado pela célula. Sua função é fazer com que a proteína N se ligue ao RNA viral (Ruigrok, Crepin e Kolakofsky, 2011), e exceto pela sua região central, a proteína P é fracamente estruturada. Os resíduos do N-terminal 1-103 e do C-terminal 200-241 formam regiões intrinsecamente desordenadas (Castagne et al., 2004; Simabuco et al., 2011). Esses domínios desordenados podem servir de local para múltiplas interações com outras proteínas (Uversky, 2011). Isto se correlaciona com as funções de P no complexo da polimerase. O domínio C-terminal de P (P_{CTD}) (resíduos 161-241) está envolvido na interação com o complexo N-RNA. Foi mostrado previamente que os últimos nove resíduos no C-terminal de P são suficientes para essa interação, e que os resíduos ácidos e hidrofóbicos são essenciais para a ligação ao complexo N-RNA, que formam estruturas semelhantes a anéis (Tran et al., 2007).

Em estudo mais recente, o sítio da proteína N ao qual P se liga foi caracterizado (Galloux, et al., 2012). Ensaios de interação com o auxílio de modelagem molecular foram utilizados para identificar a região dos aminoácidos 31 a 252 de N como ligante específica do P_{CTD} . Os resíduos hidrofóbicos e ácidos de P na região dos aa 231 a 241 são essenciais para a interação. A interação P_{CTD} -N foi conservada nos mutantes K136A, K139A, K140A de N sugerindo que estes resíduos podem interagir com outro domínio, como por exemplo a proteína L ou uma proteína celular não identificada. A substituição de uma isoleucina por um triptofano na posição 53 anulou a interação P_{CTD} -N, mostrando a importância da

hidrofobicidade nessa interação. Finalmente, a região mais crítica para a interação P_{CTD}-N ocorre na posição 132 de N, sem a carga positiva (presença de uma arginina, mutante R132A) na posição não ocorre interação (Galloux, et al., 2012).

1.10.5 Proteínas de choque térmico

Proteínas celulares de choque térmico (HSPs) são caracterizadas pela sua capacidade de facilitar o enovelamento de proteínas. A ligação da HSPs com as proteínas clientes se dá através de domínios proteicos hidrofóbicos. As HSPs têm um papel fundamental em prevenir a agregação ou malformação de proteínas recentemente formadas, ou que foram desnaturadas devido alguma mudança de condição (Hartl, 1996).

As várias HSPs diferem tanto em massa molecular como na sua localização celular. As HSPs de peso molecular 70 kDa, são as mais abundantes, representando 1-2% total do proteínas intracelulares. No citoplasma, sua isoforma (Hsc70, também conhecida como Hsp73) é expressa constitutivamente fornecendo suporte basal para o metabolismo das proteínas. Em contraste, a Hsp70 é constitutivamente expressa em níveis baixos e é altamente induzida após choque térmico (Gamer et al., 1996).

1.10.5.1 Hsp70

As proteínas Hsp70 são altamente conservadas, e esse alto grau de conservação sugere uma grande importância evolutiva (Mayer, Bukau, 2004; Mayer 2010). A proteína Hsp70 se liga a sequências hidrofóbicas expostas de outras proteínas e mantém a cadeia peptídica desenovelada até que ela possa assumir a conformação tridimensional correta. Isso impede que várias proteínas malformadas, com sequências hidrofóbicas expostas, formem agregados, que além de inúteis podem ser muito nocivos (Mayer, Bukau, 2004; Mayer 2010).

A Hsp70 possui um domínio modular presente no N-terminal chamado de domínio de ligação com nucleotídeos (NBD), de peso molecular 44 kDa e de um domínio de ligação com substrato (SBD) presente no C-terminal de 28 kDa (Figura 8, Couturier et al. 2010, Kityk et al., 2012). O SBD é dividido em duas regiões, um domínio de ligação a peptídeos (PBD) 384-543 aa da Hsp70 com o peso molecular de 18 kDa e um domínio que forma uma tampa que abre e fecha o PBD, o “Lid”. Esse *Lid* tem o peso molecular de 10 kDa e tem forma alfa-helicoideal. Para que o *Lid* possa abrir e fechar há a necessidade da associação reversível entre a ligação de ATP, hidrólise, e liberação de ADP pelo NBD. Na presença de ATP, o *Lid* é

aberto e ocorre a associação com o substrato. Na presença de ADP o *Lid* fecha ocorrendo a dissociação com o substrato. Os ciclos de troca são portanto a base das interações entre Hsp70 e o substrato (Kityk et al., 2012).

Figura 8- Representação esquemática da organização Hsp70 humana.

Fonte: Couturier et al. (2010).

1.10.5.2 Hsp40

As proteínas Hsp40s pertencem a uma grande família de proteínas, que especificam a ação das proteínas Hsp70s. Os membros da Hsp40s têm domínios estruturais diferentes e podem ser divididos em três subgrupos: Subgrupo I: DNAj, Ydj1, Hdj-2, ERj-; Subgrupo II: Hdj-1, CbpA e Sis-1; Subgrupo III: Sec63, ERJ2, Zuotin, Csp, Auxillin, Swa2 (Venter et al., 2001).

1.10.5.3 Interação entre Hsp70 e Hsp40

A participação da Hsp40 nos processos de que envolvem a Hsp70 é muito importante para a célula como também para os processos de replicação viral onde a Hsp70 medeia algumas das interações das proteínas virais. Sabe-se os vírus SV40 e papilomavírus utilizam Hsp40 mediando a ação de Hsp70 para a expressão das proteínas virais (Li et al., 2009; Liu et al., 1998). A Hsp40 também participa da interação entre a Hsc70 e a transcrição reversa dos Hepadnavírus (Beck, Nassal, 2003).

A Hsp40 possui a função de catalisar as reações de ATP-ADP com a Hsp70, em proporção subestequiométrica. O domínio J da Hsp40 interage com o NBD da Hsp70 e estimula a função de ATPase, permitindo que a Hsp70 se ligue à proteína cliente uma vez que na presença de Hsp40 o *Lid* estará aberto (Suh et al., 1998).

1.10.6 NPM

A nucleofosmina (NPM), também chamada de B23-proteína nucleolar, é uma fosfoproteína abundante, que é expressa em todas as células e altamente conservada. O gene NPM (NPM1) está localizado no cromossomo 5 (5q35) e contém 12 exons (Chang, Olson, 1990). Essa proteína fica localizada principalmente no nucléolo, mas consegue se mover rapidamente entre o núcleo e o citoplasma (Borer et al., 1989). A NPM tem papel importante em muitos processos celulares básicos. Possui atividade molecular de chaperona incluindo a inibição da agregação das proteínas em geral, proteção contra a perda da atividade de enzimas durante desnaturação térmica e promoção de renaturação de proteínas desnaturadas quimicamente (Szebeni, Olson, 1999).

Além disso, ela desempenha um papel fundamental no ribossomo através de suas propriedades que asseguram o transporte adequado dos componentes deste do núcleo para o citoplasma, e impedindo a agregação das proteínas durante sua montagem (Yu et al., 2006). Outros papéis da NPM na biogênese dos ribossomos incluem a sua atividade RNase intrínseca (Herrera et al., 1995), e a capacidade de processamento de moléculas pré-RNA (Savkur, Olson, 1998).

A NPM também funciona como uma chaperona aumentando transcrição acetilação-dependente (Okuwaki et al., 2001). Assim, NPM parece ser importante na regulação da síntese protéica, crescimento e proliferação celular. Também é importante na manutenção da estabilidade genômica regulando duplicação do centrôssomo (Okuda et al., 2000).

1.10.7 PRMT5

A metilação pós-tradução de resíduos de lisina e arginina é realizada pelas proteínas PRMTs alterando a atividade e interações das proteínas com substrato, sendo importante para diversas funções celulares (Bedford, Clarke, 2009). A família PRMTs é enquadrada na classe de enzimas S-adenosilmetionina (AdoMet) responsáveis pela transferência de grupos metila para as cadeias laterais de arginina de histonas e outras proteínas. As PRMTs são subdivididas

nos tipos: I, II, III e IV e com base nos padrões de metilação da arginina. Onze PRMTs humanas foram identificadas até o momento (Wolf, 2009). Todas as PRMTs são altamente conservadas no seu domínio catalítico, e contêm vários domínios adicionais que modulam sua atividade e especificidade (Antony et al., 2012).

A proteína arginina metil-transferase-5 (PRMT5) é responsável pela metilação de argininas em vias que afetam a modulação dos processos de transporte e estabilidade do mRNA (Lee, Bedford, 2002; Yu et al., 2004). Além disso, a PRMT5 participa na metilação de histonas como H2A e H4 e modula tanto as funções da RNA polimerase II como as funções dos *spliceossomos* (Krause et al., 2007). Essa proteína também é responsável pela metilação dos nucleossomos nos resíduos de arginina, onde é conhecida por modular a sua atividade e influenciar a taxa de transcrição do promotor Stat que regula vários aspectos da sobrevivência, crescimento e diferenciação celular (Lee et al., 2005).

A PRMT-5 se associa com várias proteínas celulares (Sm; nucleolina; p53; as histonas H2A, H3 e H4; SPT5 e MBD2) permitindo que vários substratos citoplasmáticos e nucleares sejam metilados. Com isso esses complexos desempenham um papel no processamento de RNA, a remodelação da cromatina e controle da expressão gênica (Bedford, Clarke, 2009). Também regula a biogênese do ribossomo por meio de metilação da proteína ribossômica S10 (RPS10) (Ren et al., 2010) e desempenha um papel essencial na sobrevivência das células através da regulação da expressão de eIF4E e da tradução de p53 (Tee et al., 2010).

1.10.8 WDR77

A Proteína celular WDR77 também conhecida como p44 ou Mep50 é uma proteína de 44 kDa, que contém 342 resíduos de aminoácidos e quatro WD40 *repeats*. Essa proteína interage com, e aumenta a atividade transcricional do receptor de andrógeno atuando como um co-fator (Peng et al., 2008). Essa proteína também faz parte da subunidade de sobrevivência dos complexos dos neurônios motores (SMN) (Grimmler et al., 2005). Além disso, a WDR77 está presente no complexo do metilossomo juntamente com a proteína celular arginina metil transferase 5 (PMRT5). Sabe-se que as proteínas PRMT5 e WDR77 integram o complexo do metilossomo e que são simetricamente dimetiladas nos resíduos de arginina e lisina (Friesen et al., 2002).

1.10.9 Interação entre PRMT-5 e WDR77

As proteínas PRMT5 e a WDR77 foram inicialmente identificadas como componentes integrantes do complexo 20S, denominado metilossomo (Friesen et al., 2002). Essas proteínas também foram identificadas como componentes do complexo FCP1, sugerindo uma ligação entre a transcrição e processamento do RNA (Licciardo et al., 2003). O complexo das proteínas PRMT5-WDR77 (ou MEP50) humanas foi caracterizado por cromatografia, análise de sedimentação, enzimologia e cristalografia de raios-X. O complexo PRMT5-MEP50 forma um hetero octâmero de 450 kDa. É provável que o módulo de quatro unidades de PRMT5 e quatro unidades de MEP50 seja o núcleo estrutural que interage com as proteínas parceiras para formar a multiplicidade de complexos de múltiplas subunidades com especificidades e funções distintas (Antony et al., 2012).

Figura 9 - Estrutura do complexo PRMT-5-MEP50 humano.

Fonte: Antony et al. (2012).

1.10.10 Tropomiosina

A tropomiosina (TM) pertence à família de ligantes de actina, e possui um papel central na regulação dos filamentos de actina em células musculares e não musculares. Essas proteínas são dímeros *coiled-coil* que se ligam ao longo dos filamentos de actina. Em células não musculares múltiplas isoformas de tropomiosina são expressas e essa proteína participa em vários eventos celulares que envolvem a formação do citoesqueleto (Gunning et al., 2008). Já foi também descrito que a tropomiosina participa na regulação da formação da actina (Wang, Coluccio, 2010).

Historicamente pensava-se que a actina e suas proteínas de ligação só existiam no músculo. Com a descoberta da actina no citoesqueleto das células não musculares, tornou-se comum falar de isoformas musculares e não musculares. Em seguida, tornou-se claro que as células musculares também contêm um citoesqueleto, que é fisicamente distinto, composto por um sistema contrátil (Gunning, O'Neill e Hardeman, 2008).

Figura 10- Cristalografia da Tropomiosina.

Fonte: Brown et al. (2005a).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto é caracterizar a interação das proteínas Nucleoproteína, Fosfoproteína e Matriz do Vírus Respiratório Sincicial Humano com proteínas celulares, e discutir como essas interações se encaixam nos modelos de replicação viral. Aproveitando as ferramentas de expressão desenvolvidas nesse processo, visamos também testar as propriedades imunogênicas da Nucleoproteína e da Fosfoproteína.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Interação das proteínas virais com as proteínas celulares

- 1 - Demonstrar a interação das proteínas N, P e M do HRSV com as proteínas celulares HSP70, PRMT5, WDR77, Nucleofosmina e Tropomiosina, através de experimentos de co-imunoprecipitação em extratos de células transfectadas com vetores de expressão dos genes virais ou infectadas pelo vírus.
- 2 - Clonar os genes celulares em vetores de expressão bacteriana visando estudos de interação *in bactéria* ou *in vitro*. Definir um deles como objeto de estudo.
- 3 - Estudos *in bactéria* e *in vitro* da interação entre a proteína celular Hsp70 e as proteínas virais N e P, com detalhamento dos domínios interagentes.
- 4 - Detectar a localização e co-localização intracelular de corpúsculos de inclusão e de Hsp70, em situações em que as proteínas virais N e P são co-expressas, utilizando imunofluorescência ou ensaio de mini-genoma.

2.2.1 Testes de imunização

- 5 - Fazer ensaios de imunização em camundongos com pShuttleNopt ou pShuttlePopt e caracterizar a resposta humoral e a celular contra as proteínas N e P.
- 6 - Fazer ensaios de imunização em camundongos com as proteínas de fusão MBP-P ou MBP-N e caracterizar a resposta humoral e a celular contra as proteínas N e P.
- 7 - Fazer ensaios de desafio com HRSV em camundongos pré-imunizados com pShuttleNopt, pShuttlePopt, MBP-P ou MBP-N.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos descritos em Sambrook et al. (1989); Ausubel et al. (1994); Bollag et al. (1996) e Harlow, Lane (1988), serviram de base para as técnicas de biologia molecular e de imunologia, que foram utilizadas nesta Tese.

3.1 Células e vírus

As células HEK293T são provenientes de rim humano, que crescem em monocamadas, não apresentam junções *tight*, e não expressam as claudinas 1, 3 e 4, consequentemente elas apresentam um fenótipo indiferenciado sendo células altamente transfectáveis. Essas células expressam o antígeno T do vírus SV40.

HEp-2: São células humanas, isoladas originalmente de carcinoma epitelial de laringe contaminada com HeLa, o que gerou a linhagem atual. A infecção e o efeito citopático do HRSV A2 são muito bem caracterizados nessa célula.

Foram duas linhagens foram cultivadas em meio MEM suplementado com soro fetal bovino (10 %) e Gentamicina 40 µg/mL adquiridos da Cultilab/Atena, Campinas-SP. A incubação sempre foi em estufa a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO₂.

Foi utilizado o vírus protótipo A do HRSV (cepa A2), gentilmente cedido pela Dra. Marilda Siqueira (Departamento de Virologia da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil).

3.2 Plasmídeos

Os plasmídeos pMAL-N e pMAL-P (Simabuco et al., 2007), pShuttleNopt e pShuttlePopt (Simabuco et al., 2009), pFLAG-N, pFLAG-P, pFLAG-M, pFLAG), foram anteriormente construídos no laboratório e foram utilizados para os experimentos desse projeto.

3.3 Bactérias

Foram utilizadas bactérias *E.coli*:

DH5a *supE44 ΔalcU169 (80lacZϕM15) hsdR17 recA1 endA1 gyra96 thi-1 relA1* (Sambrook et al., 1989).

BL21 (DE3) pLysS: Células que permite a expressão de proteínas, com alta eficiência de qualquer gene sob o controle do promotor T7 e possui local de ligação ao ribossomo. Essa bactéria é lisogênica para λ -DE3, que contém o gene bacteriófago T7 I, que codifica RNA-polimerase T7 sob o controle do promotor *lac* UV5. Também contém um plasmídeo, pLysS, que transporta o gene que codifica para a lisozima de T7. Genótipo: F- ompT gal dcm lon hsdSB (rB- mB-) λ (DE3) pLysS (cmR).

3.4 Transformação de bactérias por eletroporação e plaqueamento

Para a transformação em bactérias, foram eletroporados 10 ng de DNA em 50 μ l de *E. coli* DH5 α ou BL21 (DE3) pLysS eletrocompetentes a 2,5 kV, e a recuperação foi feita em meio SOC a 37 °C por 1 hora. O produto da eletroporação foi plaqueado e incubado por 16 horas a 37 °C em LB [10 g de Triptona; 5 g de Extrato de Levedura; 10 g de NaCl; e H₂O q.s.p 1 L e ágar 0,7 % contendo antibiótico (ampicilina 100 μ g/ml ou Kanamicina 50 μ g/ml Sigma para seleção)]. Uma colônia foi utilizada para fazer um pré-inóculo em 1 ml. Esse pré-inóculo foi utilizado para inocular 500 ml de LB líquido/antibiótico a 37 °C por cerca de 16 horas.

3.5 Extração e purificação de DNA plasmidial

Após o crescimento em meio líquido LB [10 g de Triptona; 5 g de Extrato de Levedura; 10 g de NaCl; e H₂O q.s.p 1 L contendo antibiótico (Ampicilina 100 μ g/ml ou Kanamicina 50 μ g/ml Sigma para seleção)], a suspensão bacteriana foi coletada por centrifugação a 12.000 r.p.m. e o DNA plasmidial extraído seguindo a metodologia de lise alcalina Ausubel et al. (1994). Para experimentos de imunização, que exigem maior grau de purificação, utilizamos o PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit (Invitrogen ®) ou o QIAGEN® Plasmid Midi Kit (100), conforme as instruções do fabricante.

Alternativamente foi feita purificação em gradientes de densidade (Cloreto de Césio, Sigma) seguindo a metodologia convencional descrita em Ausubel et al., 1994.

3.6 Transfecção de células de mamíferos

Foram utilizadas as metodologias, descritas a seguir.

- PEI: para cada 6×10^4 células em placas de petri foram utilizados 3 μ l de PEI (polyethyleneimine, Sigma) a 1 mg/ml diluído em H₂O MilliQ foram adicionados a cada 1 μ g de DNA em uma solução de NaCl 150 mM. A mistura foi incubada por 20 min a 56 °C e adicionada à monocamada de células recoberta por meio MEM com 10 % de SFB (Soro Fetal Bovino). Após 3 horas, o meio foi trocado por meio fresco e as células incubadas por 24 a 72 horas.

- Lipofectamine PLUS (Invitrogen®): Foram misturados 730 μ l de MEM sem soro com 8 μ g de DNA e 20 μ l do reagente PLUS e incubados por 15 min a T.A. A essa mistura foram adicionados 720 μ l de MEM sem soro combinado com 30 μ l de Lipofectamina e incubados por 15 min a T.A. Uma placa de 10 cm de diâmetro, contendo células a uma confluência de cerca de 70 %, foi então lavada com MEM sem soro e coberta com 5 ml de meio sem soro. Posteriormente foram adicionados os 1,5 ml da solução contendo DNA, reagente PLUS e Lipofectamina. Após 3 horas, o meio foi trocado por MEM com 10 % de SFB e as células incubadas por 24 a 72 horas.

3.7 Western Blotting

Após a corrida em SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (Amersham Biosciences®) e foi incubada com solução de bloqueio (Tween 20 0,1 %, leite em pó desnatado 5 % em PBS) por 16 h a 4 °C. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário por 1 h a T.A. A membrana foi lavada 3 x com solução de lavagem (0,1 % Tween 20 em PBS) a T.A. por 10 min, e incubada com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase por 1 h a T.A., e corepetidos os procedimentos de lavagem por 3x. Essa membrana foi então tratada com SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce ®) por 5 min, exposta a Hyperfilm (Amersham Biosciences ®) por 15 min e revelada, em câmara escura.

3.8. Imunoprecipitação

Para realizar a co-imunoprecipitação ou a co-imunoprecipitação “reversa”, células HEK293T foram transfectadas com os vetores pcDNA-FLAG-P, pcDNA-FLAGN, pcDNA-FLAG-M e pcDNA-FLAG (10 placas de 10 mm / plasmídeo, 20 μ g de DNA / placa). Após dois dias as células foram lavadas com PBS e lisadas com tampão de lise celular (Cell

Signaling®) contendo inibidores de protease (Sigma®) e inibidores de fosfatase (Sigma®). Primeiramente os lisados foram tratados com G-Sepharose (para ser realizado o *pré cleaning*) sob agitação a 4° C por 1h, seguindo-se centrifugação a 8.000 rpm a 4 °C por 10 min. O *pellet* foi descartado e em seguida ao sobrenadante foi adicionado um dos seguintes anticorpos: anti-FLAG (Sigma-Aldrich ®) 1:2000, anti-HSP70 (Sigma-Aldrich®) 1:1500, anti-TPM (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 1:2000, anti-PRMT5 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 1:1500, anti-NPM (Sigma-Aldrich ®) 1:2000 ou anti-WDR77 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 1:2000. Após 1 h com agitação a 4 °C foi adicionada G-Sepharose, seguindo por mais 1 h com agitação a 4 °C. Os complexos G-Sepharose-Ac-proteínas foram obtidos por centrifugação, lavados com PBS, e as proteínas extraídas com tampão Laemmli e analisadas por *Western Blotting*.

Para realizar a co-imunoprecipitação após infecção, células HEK293T (confluência entre 50-70 %), foram infectadas ou não com HRSV. Após um dia foi obtido lisado celular, feitas as imunoprecipitações com os anticorpos das proteínas celulares e *Western Blotting* como descrito no item 3.7. Como anticorpos secundários, dependendo do experimento, foram utilizados os descritos acima, ou soros contra M, N e P produzidos em nosso laboratório por imunização de camundongos Balb-C com as proteínas M, Mal-N e Mal-P (Oliveira et al., 2013; Simabuco et al., 2009).

3.9 Material e Métodos utilizados durante o estágio no INRA- França

3.9.1 Plasmídeos

Às figuras 1, 12 e 13 estão apresentados os vetores pET28, pGex-4T-3 e pcDNA3.1, respectivamente, utilizados para as clonagens realizadas neste trabalho, ou nos quais plasmídeos anteriormente construídos foram baseados.

Figura 11 - Mapa do vector pET28a. Novagen.

Fonte: BioTech Plasmid (2005) ^a.

Figura 12 - Mapa do vector pGex-4T-3. GE Healthcare.

Fonte: BioTech Plasmid (2005) ^b.

Figura 13 - Mapa do vetor pcDNA3.1. Invitrogen™.

Fonte: Kansas University (2013).

Os plasmídeos anteriormente construídos que já estavam disponíveis no laboratório do Dr. Eleouet no INRA são: pGex-P, pGex-P (1-163), pGex-P (127-241), pGex-P (127-205), pGex-P (1-126), pGex-P (120-160), pGex-N, pET-P, pET-N, pET-N (1-252), pET-N (31-252) N_{NTD}, pET-N (252-391), pET-N 132R, pET-N°, pET-M, pET-M2.1.

Do nosso laboratório levamos os seguintes plasmídeos: pHsp70 (clone humano sc116766) da Origene, e os plasmídeos da GeneArt com sequências dos genes Hsp70, Tropomiosina, Nucleofosmina, WDR77 e PRMT-5 otimizados para bactérias. Vieram clonados pMA-RQ ou pMA-T flanqueados pelos sítios de restrição para *BamHI* e *XhoI*.

3.9.2 Oligonucleotídeos para construções de Hsp70

Os oligonucleotídeos foram desenhados utilizando-se o programa DNASTar® e baseado na sequência do clone da Hsp70 adquirido da Origene. Os oligonucleotídeos listados abaixo foram utilizados para construção dos plasmídeos gerados por mutagênese dirigida: pGex-Hsp70 C-Terminal, pET-Hsp70 C-Terminal, pGex-Hsp70Δ-Lid e pET-Hsp70Δ-Lid. E por subclonagem: pGex-Hsp70 N-Terminal, pET-Hsp70 N-Terminal.

Quadro 1 - Oligonucleotídeos usados nas construções de Hsp70.

HSP70384STOP+	CGGCCATCCTGATGGGGGACTAGTCCGAGAACGTGCAGGAC
HSP70384STOP-	GTCCTGCACGTTCTCGGACTAGTCCCCCATCAGGATGGCCG
HSP70381BAM+	GAGGAGGGATCCATGGGGGACAAGTCCGAGAACGTGC
HSP70XHO-	GAGGAGCTCGAGCTAATCTACCTCCTCAATGGTGGG
HSP1100+	ACAAGAGCATCAACCCCGACGA
HSP70stop544+	GTCAGCCAAGAACGCCCTGGAGTAATACGCCTTCAACATGAAG
HSP70stop544-	CTTCATGTTGAAGGCGTATTACTCCAGGGCGTTCTTGGCTGAC

Os sítios de restrição incorporados são mostrados em vermelho e os códons de terminação estão mostrados em azul.

3.9.3 Clonagem dos genes das proteínas celulares HSP70, Tropomiosina, Nucleofosmina, WDR77 e PRMT-5

Os genes celulares foram otimizados para expressão em bactéria e sintetizados pela GeneArt®. Foram enviados no vetor padrão da empresa pMA-RQ, flanqueados pelos sítios *BamHI* e *XhoI*. Esses sítios foram adicionados para realizar a subclonagem nos vetores pET28a, pGEX-4T-3 e pcDNA3.1

Resumidamente, os vetores contendo os genes com sequencias otimizadas foram digeridos com as enzimas *BamHI* e *XhoI* (New England BioLabs Inc), assim como os vetores pET28a, pGEX-4T-3 e pcDNA3.1. Para essas digestões foi utilizado o tampão Fast Digest da Thermo Scientific®, com incubação a 37 °C por 30 minutos.

3.9.4 Purificação dos fragmentos de DNA com os genes celulares

Após a digestão dos genes e dos plasmídeos com as enzimas *BamHI* e *XhoI* (New England BioLabs Inc), estas digestões foram corridas em gel de agarose UltraPure™ Low Melting Point Agarose e o gel foi corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™).

O DNA foi então, extraído do gel e purificado utilizando o Kit Qiaquick Gel Extraction da Qiagen. Para a realização dessa extração foi seguido o protocolo do fabricante descrito aqui brevemente. Para cada 100 mg de DNA + gel de agarose, colocados em tubos *ependorfs*, foram adicionados 300 µl de tampão QG, e incubados a 50°C por 10 minutos ou até que o gel ficasse completamente dissolvido. Após esse procedimento, foi adicionado 1 volume do gel de isopropanol e misturado. Essa mistura foi colocada na coluna QIAquick fornecida no kit, centrifugada por 1 minuto a 10.000x g., e o *flow-through* descartado. A lavagem dessa coluna foi feita com 750 µl de tampão PE e centrifugada por 1 minuto a

10.000x g. Para a eluição do DNA foram adicionado 50 µl de tampão EB (10 mM de Tris·Cl, pH 8.5) deixada por 1 minuto na bancada e centrifugada por 1 minuto a 10.000 x g.

3.9.5 Ligação do DNA dos genes celulares com os plasmídeos

Os fragmentos com os genes das proteínas celulares foram misturados aos respectivos plasmídeos, já purificados, na proporção de 3:1. A essas misturas foram adicionados: 1 µl T4 DNA Ligase; 5 µl de Tampão 5X Rapid Ligation; água livre de nuclease, para completar o volume, todos estes fornecidos no Rapid DNA Ligation Kit da Thermo Scientific®. Dessa reação 5 µl foram utilizados para transformar 50 µl de bactérias quimio-competentes *E. coli* DH5α preparadas no laboratório.

3.9.6 Transformação das bactérias quimio-competentes

A transformação das bactérias quimio-competentes *E. coli* DH5α e BL21 (DE3) pLysS foi realizada através de choque térmico. Primeiramente o DNA foi incubado com a bactéria e deixado no gelo por 30 minutos. Após esse tempo, DNA + bactéria foram levados a um banho-maria a 42 °C por 1 minuto, e rapidamente incubados novamente no gelo por 6 minutos. Para a recuperação da parede bacteriana foi adicionado 300 µl de meio LB e levado a outro banho-maria a 37 °C por 1 hora. Após essa recuperação 200 µl de bactéria foram plaqueados em placas de LB-ágar contendo antibiótico específico para o plasmídeo.

3.9.7 Análise dos clones

Após a obtenção dos clones, esses foram submetidos à análise por PCR de colônia, colocando-se uma amostra de cada colônia em reações de PCR antes de serem inoculadas em meio líquido. As reações desse PCR foram feitas utilizando os oligonucleotídeos dos vetores pGEX-4T-3, pET 28a e pcDNA.3, descritos anteriormente.

O DNA plasmidial extraído das colônias obtidas, foi feito utilizando o kit da Macherey-Nagel NucleoBond® PC 20 Mini gravity-flow columns, o protocolo foi seguido segundo a recomendação do fabricante e descrito brevemente aqui. Clones de cada subclonagem foram selecionados e colocados para crescer separadamente em meio LB + antibiótico, *overnight*. Pela manhã essa cultura bacteriana foi centrifugada e o *pellet* ressuspensionado com 400 µl de tampão S1. Em seguida, para realizar a lise da parede bacteriana foram adicionados 400 µl de tampão S2 e 400 µl de tampão S3. Foi então realizada centrifugação por 10 minutos a 12.000x g e o sobrenadante colocado na coluna de ligação ao

DNA fornecido pelo Kit. A coluna então foi centrifugada por 10 minutos a 12.000 x g e o *flow-through* descartado. Para a lavagem foi utilizado 1 ml de tampão N3 e o DNA eluído com 50 µl de tampão N5.

O DNA extraído a partir da miniprep foi digerido com as enzimas *BamHI* e *XhoI* e analisados em gel agarose. Após essas confirmações o DNA plasmidial foi diluído em água MilliQ na concentração de 100 mg/µl e submetido a sequenciamento em um serviço terceirizado utilizado pelos laboratórios do INRA.

3.9.8 Expressão das proteínas celulares *Hsp70*, *PRMT-5*, *WDR77*, *TM* e *NPM*

Após a confirmação das sequências dos genes celulares nos plasmídeos pGEX-4T-3 e pET 28a, esses plasmídeos foram utilizados para transformar bactérias quimio-competentes *E.coli* BL21 pLys para iniciar os experimentos de expressão dessas proteínas. A transformação das bactérias quimio-competentes *E.coli* BL21 pLys foi realizada através de choque térmico (ver item 3.9.6). As colônias coletadas foram semeadas em 2 ml de LB como pré-inóculo. Esse pré-inóculo foi então transferido para 200 ml de LB a 37°C e a cultura monitorada até chegar a D.O. de 0,6. Foi adicionado IPTG para a concentração final de 0,33 mM, seguindo incubação *overnight* a 28 °C. Pela manhã essas bactérias foram centrifugadas e do *pellet* bacteriano, foi feita a extração e purificação das proteínas celulares.

3.9.9 Purificação das proteínas *GST-Hsp70*, *GST-WDR77*, *GST-PRMT-5*, *GST-TM* e *GST-NPM* (clonagem em pGEx-4T-3)

O sistema de purificação é baseado na ligação da proteína Glutathione S-transferase (GST) à glutathione ancorada à sefarose (*Glutathione Sepharose Beads*), a que no texto nos referiremos como GST e *GS-beads*, respectivamente. O *pellet* bacteriano, obtido como descrito no item 3.9.8, foi ressuspensionado em 10 ml de tampão de lise [50 mM de Tris pH 7,8, 2 mM de DTT, 1 mM de EDTA, 4 mM de benzamidina, 0,2 % de Triton X-100 e 1 pílula de coquetel antiprotease Roche ® (*Serine and Cysteine proteases*) para 50 ml], adicionado 10 mg/ml de lisozima, e deixado a -20 °C por 2 horas. Após o descongelamento foi adicionado 2 µl, 2.5ku, de benzonase Novagen® e deixado em leve agitação até obter uma consistência líquida. Após isso, essa solução foi centrifugada por 20 minutos a 3.000 x g e o sobrenadante incubado com 1 ml de *beads* de GST (GE Healthcare Glutathione Sepharose 4B) + PBS pH

7,0 por 3-4 horas a T.A. ou *overnight* a 4° C em agitação. Após esse procedimento as *beads* foram lavadas 3 x com tampão de lise e 3 x com PBS e estocadas a 4 °C.

3.9.10 Purificação das proteínas *His-Hsp70*, *His-WDR77*, *His-PRMT-5*, *His-TM* e *His-NPM* (clonagem em *pET-28a*)

O *pellet* bacteriano, obtido como descrito no item 3.9.8, foi ressuspendido em 10 ml de tampão de lise [20 mM de Tris, 500 mM de NaCl pH 8,0; 10 mM de Imidazol; 0,2 % de Triton X-100 e 1 pílula de coquetel Roche ® (*Serine and Cysteine proteases*)] adicionado 10 mg/ml de lisozima, e deixado a -20 °C por 2 horas. Após o descongelamento foi adicionado 2 µl, 2.5 ku, de benzonase Novagen® e deixado em leve agitação até obter uma consistência líquida. Após isso, essa solução foi centrifugada por 20 minutos a 3.000 x g e o sobrenadante incubado com 1 ml de *beads* de Niquel His-60 Ni Superflow™ Resin Clontech Laboratories, Inc. e deixado em leve agitação por 2 horas. As *beads* foram então lavadas duas vezes com imidazol diluído em tampão de 20 mM de Tris e 500 mM de NaCl pH 8,0 em três diferentes concentrações: 10 mM de imidazol, 50 mM de imidazol e com 100 mM de imidazol. Após essas lavagens as *beads* foram estocadas a 4°C.

3.9.11 Co-expressão das proteínas virais com as proteínas celulares

Para a co-expressão das proteínas virais com as proteínas celulares foram utilizados os plasmídeos com genes virais e celulares clonados nos vetores pGex-4T-3 e pET, respectivamente. Primeiramente as bactérias foram transformadas com 1 µg de cada plasmídeo e plaqueadas em placas com ampicilina e kanamicina para selecionar os clones que tivessem ambos plasmídeos.

Após a expressão das proteínas fusionadas com GST e com cauda His, provenientes do pGex-4T-3 e do pET, respectivamente, foi realizada a purificação utilizando *beads* de GST (GE Healthcare Glutathione Sepharose 4B), como descrito no item 3.9.9.

3.9.12 Clivagem da proteína de fusão GST utilizando a enzima trombina

Para clivar a proteína de fusão e separar GST das proteínas celulares foi utilizado o kit de clivagem Thrombin Cleavage Capture Kit Novagen®. Para isso, a cada 200 µl de *beads* foi adicionado 0,1 µl de trombina biotinilada 50 U e DTT para 1 mM, seguindo incubação

overnight a T.A. No dia seguinte ao sobrenadante foram adicionados 10 µl de resina de agarose-estreptavidina Novagen® para a remoção da enzima.

3.9.13 Gel filtração

Para o procedimento de gel filtração foi executado o protocolo de cromatografia de exclusão por tamanho, utilizando o sistema Äkta explorer system (GE Healthcare). As amostras foram corridas em colunas Superdex 200 e em tampão PBS pH 7,5. O volume de cada fração de proteína após a purificação foi de 1 ml por tubo, na velocidade de 1 ml/min.

3.9.14 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As medições de RMN foram feitas em espectrômetro Bruker Avance 950 MHz equipado com cryoprobes de ressonância tripla, no *Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS* – França. Esse procedimento foi realizado e os dados analisados pela Dr^a Cristina Sizun. A proteína N_{NTD} marcada com ¹H¹⁵N foi produzida em meio M9-2H, preparado com 99% D₂O (Eurisotop, França) e suplementado com 1 g /L de ¹⁵NH₄Cl e 2 g / L de ¹H glicose. Para a pré-cultura foram utilizados 100 ml que foi usada para inocular 1 L de meio M9 (não marcada). Após 2 h de incubação, a cultura não marcada foi centrifugada e em seguida ressuspensas em 100 ml ¹H-M9. Após 1 h de crescimento, a cultura foi centrifugada novamente, o sedimento ressuspensa em 900 mL de ¹H-M9 e expressão induzida durante 15 h a 28 ° C.

Para as incubações de N_{NTD} com HSP70 também foi utilizado 10 mM de MgATP. As proteínas N_{NTD} e HSP70 foram analisadas na razão de 1:2 na concentração de 50 µM para a proteína N_{NTD}. Essas amostras foram analisadas no espectro de ¹H-¹⁵N-HSQC.

3.9.15 Obtenção dos clones de Hsp70 N-terminal por mutagenese sítio dirigida

A mutagenese dirigida é uma técnica valiosa para estudar estrutura e função das proteínas e expressão genética, e para a realização de modificação de vetores. O kit de mutagenese dirigida da QuikChange de Stratagene ® permite inserir virtualmente qualquer mutação na cadeia dupla de um plasmídeo, eliminando assim a necessidade de subclonagem em vetores de bacteriófago M13. Além disso, esse sistema não necessita de vetores especializados, sítios de restrição, ou várias transformações. O método QuikChange

mutagenese sítio dirigida é realizada utilizando DNA-polimerase PfuTurbo[®] e um termociclador. A DNA polimerase PfuTurbo[®] replica ambas as cadeias do plasmídeo com elevado nível de fidelidade. O procedimento básico utiliza um vetor de DNA (dsDNA) *supercoiled* e dois iniciadores sintéticos que contêm a desejada mutação. Incorporação dos iniciadores gera uma mutação no plasmídeo. Após a finalização dos ciclos de temperatura, o DNA é tratado com DpnI. A enzima DpnI tem como sequência alvo: 5'-Gm6ATC-3' que está presente no molde parental (DNA metilado e hemi-metilado). O DNA isolado de quase todas as cepas de *E. coli* é metilado e, portanto, susceptível a digestão por Dpn I, assim é possível obter o plasmídeo com a mutação uma vez que ele não é metilado (manual Stratagene's QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit).

Para a obtenção dos plasmídeos pGex-Hsp70 N-terminal e pET- Hsp70 N-terminal pela estratégia de mutagenese sítio dirigida foi utilizado o kit QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit - Stratagene[®]. O protocolo foi seguido conforme as especificações do fabricante, descritas brevemente a seguir. Para cada reação foi adicionado 5 µl do tampão de reação 10x; 50 ng do DNA plasmidial; 10 µM de cada oligonucleotídeo (HSP70384STOP+ e HSP70384STOP – descritos na tabela 2); 1 µl de dNTP; 1 µl da polimerase PfuTurbo DNA e o volume ajustado para 50 µl com água MilliQ. Para a reação de PCR foram utilizados os seguintes parâmetros: 1 ciclo de 95° C por 30 segundos e 20 ciclos de 95 °C por 30 segundos; 55 °C por 1 minuto; e 68 °C por 1 minuto/ kb plasmidial.

Após a reação de PCR foi adicionado por tubo 1µl da enzima de restrição DpnI, fornecida pelo kit, e incubado a 37 °C por 1 hora para digerir o DNA plasmidial parental *supercoiled*. Bactérias *E.coli* DH5α foram transformadas com 1 µl da reação e os clones obtidos submetidos a sequenciamento, em um serviço terceirizado utilizado pelos laboratórios do INRA.

3.9.16 Células

As células BHK-21 são fibroblastos de rim de hamsters da espécie *Mesocricetus auratus*, obtidas de animais com um dia de idade. Foram obtidas em março de 1961 por Macpherson e Stoker, e a linhagem utilizada atualmente é o sub clone 13 (Molecular Expression[™] 2004).

As células BSRT7/5 são derivadas de células BHK-21 (clone BSRT7/5) que expressam constitutivamente a RNA polimerase T7 e são cultivadas em meio Dulbecco

essencial modificado (Lonza, Alemanha) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM glutamina e antibióticos (Buchholz, Finke e Conzelmann, 1999).

3.9.17 Minigenoma

O desenvolvimento do minigenoma como ferramenta de estudo vem do domínio da genética reversa do HRSV, em que a partir de um clone do genoma viral transcrito pela RNA polimerase do fago T7 é produzido um RNA genômico do vírus no citoplasma, que serve de substrato para o conjunto de proteínas virais responsáveis pela transcrição e replicação do genoma, também no citoplasma celular (Collins et al., 1995).

A versão utilizada aqui, foi adaptada mais recentemente valendo-se da habilidade das células BSRT7/5 em expressar constitutivamente a polimerase T7, e do elemento CITE que posiciona uma estrutura IRES (*internal ribosomal entry site*) no 5' do mRNA para maior eficiência de tradução, e vem sendo utilizada pelo grupo do Dr. Eleouet (Fix et al., 2011; Tran et al., 2009). É composta por vetores pCITE com os genes N, M2-1, P e L do HRSV clonados e que fornecem todas as proteínas virais responsáveis pela transcrição do genoma viral. O minigenoma (pM-Luc) também é clonado em pCITE e é composto pelos elementos *Leader* e *Trailer* (le e tr, respectivamente à Figura 3B), flanqueando o gene repórter luciferase. Esse gene da luciferase, por sua vez é flanqueado pelas sequências não traduzidas GS (*gene start*) e GE (*gene end*) originalmente a 3' e a 5' do gene SH viral (Figura 3B). Como normalizador da eficiência de transfecção é utilizado outro gene repórter o β gal, sob o comando de outro promotor (LTR do vírus do sarcoma de Roux), no plasmídeo pSV β gal, Promega.

Para o ensaio, células BSRT7/5 foram semeadas em placas de 24 poços e após 24 horas de crescimento, essas células foram transfectadas com: 0,25 μ g de pCITE-N; 0,0625 μ g de pCITE-M2-1; 0,25 μ g de pCITE-P; 0,125 μ g de pCITE-L; 0,25 μ g de pM-Luc; 0,0625 μ g de pSV β -gal. Para as transfecções foi utilizada Lipofectamina 2000 e o protocolo de transfecção foi conforme o item 3.6.

3.9.18 Western Blotting

Após o procedimento de transfecção do minigenoma descrito no item 3.9.18, as células foram lavadas com 500 μ l de PBS 1x, e a descolagem das células foi feita utilizando 100 μ l de tampão PBS com 2,5 mM de EDTA por 2 minutos com leve agitação. As células foram recolhidas e transferidas para um tubo e centrifugadas 5 minutos a 1.000xg. O

sobrenadante foi descartado e lavado com 500 µl de PBS. O *pellet* foi ressuspensionado em 100 µl tampão de lise (1 M de Tris pH7,6; 5 M de NaCl, 1 % de Triton X-100; 500 mM de EDTA; 1 % de Deoxycholate; 1 pílula de antiprotease Roche® e o volume completado para 10 ml de água MilliQ) e congelado.

Após a corrida em SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando o sistema Trans-Blot Turbo Transfer System da Biorad Laboratories. Após a transferência essa membrana foi incubada com solução de bloqueio (Tween 20 0,1 %, leite em pó desnatado 5 % em PBS) por 40 minutos em T.A. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário por 1h, em T.A. A membrana foi lavada 3 x com solução de lavagem (0,1 % Tween 20 em PBS) por 5 minutos cada, e incubada com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase por 1 h em T.A., e repetidos os procedimentos de lavagem por 3 x. Essa membrana foi tratada com SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce®) por 5 min, exposta a Hyperfilm (Amersham Biosciences®) por 15 minutos e revelada, em câmara escura. Os anticorpos primários utilizados nesse experimento foram: Anticorpos contra as proteínas virais N, P e M2-1 produzidos em coelho: anti-N, anti-P e anti-M2-1 diluídos 1:1000. Esses anticorpos foram cedidos gentilmente pela Dr^a Sabine Riffault, INRA. Também foram utilizados anticorpos contra as proteínas celulares anti-Hsp70 e anti- α -tubulin, ambos da Sigma-Aldrich®. Anticorpos secundários conjugados à peroxidase, anti-coelho e anti-camundongo (PARIS, Compiègne, France), foram usados na diluição de 1:5000.

3.9.19 Imunofluorescência

Após o procedimento de transfecção do minigenoma descrito no item 3.9.18, ou a co-transfecção de pCITE-N e pCITE P como descrito no item 4.8.2 de Resultados, foi feita a análise por imunofluorescência. Primeiramente foi retirado o meio de cultivo das células e estas lavadas 1 x com PBS pH 7,5. Após essa primeira lavagem, as células foram fixadas utilizando 4 % de PFA (paraformaldeído) em T.A. por 20 minutos ou com metanol a 4 °C por 5 minutos. Após a fixação as células foram lavadas 2 x com PBS pH 7,5 e incubadas com PBS pH 7,5 contendo 0,1 % de Triton X-100 e 0,5 % de BSA (albumina bovina), por 15 minutos a T.A., para que as células fossem permeabilizadas. Após a permeabilização as células foram lavadas novamente 2 x com PBS pH 7,5, e incubadas com anticorpo primário diluído em PBS pH 7,5 contendo Tween 0,2 % e 0,5 % de BSA. Os anticorpos primários utilizados foram os mesmos anti-N e anti-P diluídos 1:1000, mencionados no item anterior, e

anti-Hsp70 da Sigma-Aldrich® ou da Abcam® na diluição de 1:2000. Após a incubação por 1 h a T.A., as células foram lavadas com PBS pH 7,5 contendo Tween 0,2 % 3 x por 5 minutos cada, e incubadas com anticorpo secundário: anti-coelho Alexafluor-488 e anti-camundongo Alexafluor-594, Alexa Fluor (Life Technologies®), na diluição de 1:2000 e diluídos em PBS pH 7,5 contendo Tween 0,2 % e 0,5 % de BSA. Após essa incubação as células foram lavadas com PBS pH 7,5 contendo Tween 0,2 % por 3 x, 5 minutos cada, e analisadas em microscópio de imunofluorescência Zeiss.

3.9.20 Quantificação da atividade da polimerase viral através da atividade da Luciferase/ β gal

Após o procedimento de transfecção do minigenoma descrito no item 3.9.18, as células foram lavadas com PBS 1 x e incubadas com 100 μ l tampão de lise [5 ml de PLB (Passive Lysis 5X Buffer Promega) + 5 μ l de 1 M de DTT] e deixadas em agitação por 10 minutos a T.A., o lisado foi recolhido e centrifugado a 2500 xg por 5 minutos e coletado o sobrenadante. Para a leitura da atividade da luciferase foram colocados 40 μ l do sobrenadante em placa branca (OptiPlate-96, White Opaque 96-well Microplate) de 96 poços. Também foi preparado o tampão de leitura (5 ml de PBL, 5 μ l de 1 M de DTT, 50 μ l de luciferina, 50 μ l de 100 mM de ATP) que foi injetado no circuito do aparelho. Para a leitura da atividade de β gal foram colocados 40 μ l do sobrenadante em placas de 96 poços de fundo transparente e adicionados 40 μ l de OPNG (200mM de fosfato de sódio pH 7.3; 2 mM MgCl₂; 100 mM β -mercaptoethanol e 1.33 mg/ml de ONPG - o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside). A leitura foi feita no aparelho Tecan's Infinite 200 multimode microplate readers.

3.10 Ensaios de Imunização

3.10.1 Expressão e purificação das proteínas MBP-N, MBP-P e MBP

E. coli DH5 α ou BL21 (DE3) pLysS foram transformadas com os plasmídeos pMAL-N, pMAL-P e pMAL (Simabuco, 2009) e crescidas, em LB contendo ampicilina (100 μ g/ml) até a DO 600 atingir o valor de aproximadamente 0,5. IPTG numa concentração final de 0,3 mM foi adicionando, seguindo incubação ou por 4 horas a 37 °C ou por cerca de 16 horas à temperatura ambiente para induzir a expressão. As células foram coletadas por centrifugação a 4.000 xg por 20 min, ressuspendidas em tampão de coluna (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 200

mM NaCl e 1 mM EDTA), congeladas e descongeladas e sonificadas a 200 W, com 8 pulsos de 15 s e pausas de 5 s, utilizando-se o sonicador S-250D (Branson®). Durante todo o processo as soluções foram mantidas em gelo. Após isso, centrifugamos as amostras a 9.000 xg por 20 min e os sobrenadantes (extratos solúveis) e os precipitados (extratos insolúveis) foram analisados por SDS-PAGE, com a finalidade de detectarmos a expressão das proteínas N ou P fusionadas a MBP.

Para a purificação das proteínas MBP-N, MBP-P e MBP utilizamos resina de amilose (*Biolabs New England Inc.* INDICAR FABRICANTE), montadas em colunas e lavadas com 8 volumes de tampão de coluna (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA). Os extratos solúveis das bactérias, diluídos 1:5 em tampão de coluna, foram aplicados com um fluxo de aproximadamente 3,75 ml a cada 10 minutos. As colunas foram então lavadas com 12 volumes de tampão de coluna, e as proteínas eluídas com tampão de coluna contendo 10 mM de maltose em 13 frações de 1 ml cada.

3.10.2 Imunização e coleta de soro dos camundongos

Os animais foram anestesiados previamente com 80 mg de quetamina Dopaln e 10 mg de xilazina Syntec por kg de animal. A imunização com proteínas purificadas foi feita injetando-se via intraperitoneal 0,5 µg/µl de proteína em um volume total de 50 µl. As amostras foram administradas misturadas com adjuvante de Freund completo na primeira administração, e nas demais com adjuvante de Freund incompleto. A imunização com DNA (ver item 3.5) foi feita via intramuscular, injetando-se 50 µl de solução contendo DNA 1 µg/µl em cada perna dos camundongos, na região do músculo quadríceps, totalizando 100 µg por dose. O DNA foi previamente complexado com fosfato de alumínio a uma concentração final de 450 µg/ml (Ulmer et al., 1999). O sangue dos animais foi coletado via retro-orbital, e o soro guardado a -20 °C para posterior análise. Ao fim do experimento os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

3.10.3 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Placas de ELISA Falt Maxi Sorp ThermoScientific-Nunc TM de 96 poços foram sensibilizadas com as proteínas MBP, MBP-N e MBP-P na concentração de 0,5 µg por poço, diluídas em 100 µl de PBS, *overnight* em temperatura ambiente. A solução de sensibilização foi removida, feito bloqueio com PBS/leite (10%) por 40 minutos a 37 °C, e em seguida

lavagem com PBS/Tween (0,05%). Foram adicionados 100 µl de diluições dos soros, incubação a 37°C por 1 hora, lavagens com PBS/Tween (0,05%), e incubação com 100 µl do anticorpo anti-IgG (H+L) de camundongo conjugado com peroxidase (KPL®) a 37 °C por 1 hora. Após lavagens com PBS/Tween (0,05%), adição de OPD em tampão Citrato-Fosfato (pH 5,0) e incubação por 15 min, foi adicionado H₂SO₄ (2M) para parar a reação e medida a D.O. a 492 nm.

3.10.4 ELISPOT (*Enzyme-linked immunosorbent spot*)

Para que pudéssemos detectar a resposta imune celular através da produção de interferon γ pelas células do baço dos camundongos utilizamos o método de ELISPOT descrito por Czerkinsky et al., 1983. Abaixo segue o procedimento:

1º dia – Foi feita a sensibilização da placa (Millipore MultiScream Filter Plate) em condições estéreis, com anticorpo monoclonal (10 µg/ml) anti-INF- γ de camundongo (BD Bioscience©) diluído em PBS *overnight* a temperatura ambiente.

2º dia – Os baços foram retirados dos animais e colocados em meio RPMI + 1 % de soro fetal bovino sendo utilizado o embolo da seringa para soltar as células, macerando-as. As células foram colocadas em tubo Falcon de 15 ml e centrifugadas 1700 rpm por 6 minutos 4 °C (Centrifuga Rotina 380R *Hettich Centrifuge - swing-out rotor 4-place*), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado. Foram feitas duas lavagens com 5 ml de meio RPMI nas mesmas condições, o *pellet* foi ressuspensionado em 1 ml de RPMI completo, as células contadas, sendo adicionadas 5x10⁶ células por poço da placa sensibilizada em 100 µl de RPMI. Antes da adição das células a solução contendo o anticorpo de captura foi aspirada, feitas 3 lavagens com RPMI + 1 % de soro fetal bovino, e bloqueio com 10 % de soro fetal bovino por pelo menos 2 h a 37° C. Além das células, a cada poço foram adicionados 250 ng de proteína (MBP-N, MBP-P ou MBP). A incubação prosseguiu por 24 horas a 37 °C em 5 % de CO₂ em condições estáticas.

3º dia - As células foram desprezadas, e a placa foi lavada 3 x com PBS e 5 x com PBS tween-20. Foram adicionados 75 µl com 2 µg/ml do anticorpo monoclonal anti-interferon gama de camundongo biotilado (BD Bioscience©) diluído em PBS-tween 20, por poço. A placa foi deixada incubando *overnight* a 4 °C protegida da luz.

4º dia - A placa foi lavada com PBS-tween 20 6 x e foi adicionada estreptavidina- peroxidase diluída 1:500 em PBS tween-20, 100 µl por poço. A placa foi revelada com o substrato da

peroxidase (50 mM Tris-HCl pH 7,5, contendo 1 mg/ml de DAB e 1 µl/ml de H₂O₂, 100 µl por poço).

3.10.5 Produção, purificação e titulação do HRSV

Células Hep-2 foram infectadas pelo HRSV A2 com M.O.I. de 0,1 em meio MEM 2 % de soro fetal bovino. Após o aparecimento dos sincícios, efeito citopatológico característico do HRSV, o meio foi retirado e a monocamada lavada 2 x com PBS. A cada garrafa foram acrescentados 2 ml de PBS-EDTA 10mM e incubadas a 37 °C por 10 min. As células foram raspadas com a ajuda de um rodinho e centrifugadas (Centrifuga Rotina 380R *Hettich Centrifuge - swing-out rotor 4-place*) a 4.000 rpm 4 °C por 10 min. O *pellet* foi ressuspensionado em 3 ml de PBS + sacarose 30 %. Essa mistura foi passada em *Dounce* Wheaton por 12 x e adicionados 0,5 ml de PBS+sacarose 30 %. Após esse procedimento a mistura foi centrifugada (Centrifuga Rotina 380R *Hettich Centrifuge - swing-out rotor 4-place*) a 4.000 rpm 4 °C por 10 min e o sobrenadante transferido para tubos *eppendorf*® e armazenado a -80 °C.

Para a purificação viral, utilizada nos experimentos de desafio, utilizamos a técnica de colchão de sacarose por ultracentrifugação (Ultracentrifuga Sorvall®). Ao *pellet* viral foi adicionada v/v de uma solução contendo sacarose 10%, 150 mM NaCl, 50mM Tris HCl, 1mM EDTA 7,4. A ultracentrifugação foi realizada a 50.000 xg por 3 horas a 4 °C. O *pellet* então foi ressuspensionado em sacarose 30 % e armazenado a -80 °C.

A titulação dos vírus foi feita por ensaio de formação de placas virais (regiões de vazios pela morte das células) em diluições seriadas do estoque viral. Nas placas com 80 % de confluência celular o meio foi retirado e adicionado 1 ml de meio 2 % de soro fetal bovino + vírus diluído. Após 2 horas o meio foi retirado e adicionados 5 ml de meio MEM 2 % de soro fetal bovino + 5 % de agarose Invitrogen, tendo sido essa mistura mantida em banho-maria a 40 °C para permanecer liquefeita até o uso. As células então foram colocadas na geladeira por 15 min, sendo em seguida retornadas à estufa para incubação. Após 5 dias as células foram fixadas com 4 % de formalina e 150 mM NaCl. A camada de meio com agarose então foi retirada cuidadosamente e essas células foram coradas com cristal violeta 0,1 %. Para o cálculo final do título foi observado o número de placas virais produzidas em cada diluição.

3.10.6 Desafio com HRSV

Os animais imunizados com pShuttle, pShuttleNopt ou pShuttlePopt, ou com as proteínas MBP-N, MBP-P e MBP receberam 20 µl de uma suspensão 10^8 pfu/ml de HRSV pela via intranasal. Cinco dias depois os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o pulmão de cada animal foi retirado, sendo uma metade utilizada para extração de RNA e a outra para histologia.

3.10.7 Extração de RNA e Real Time qPCR para quantificação de HRSV

Para a extração de RNA viral do pulmão foi utilizado 1 ml de Trizol LS reagent Invitrogen ® por 100 mg de tecido. A trituração dos tecidos foi realizada por maceração em cadinhos sob baixa temperatura com adição de nitrogênio líquido. O tecido triturado obtido foi transferido para tubos ependorf, seguindo-se a adição de 200 µl de clorofórmio e agitação vigorosa por 15 segundos no Vortex. Após incubação por 3 min a temperatura ambiente o macerado foi centrifugado a 12.000 xg por 15 min a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo. A ela foram adicionados 500 µl de isopropanol, seguindo-se agitação por inversão, incubação por 10 min a temperatura ambiente, e centrifugação a 12.000 xg por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido por inversão e o *pellet* lavado com etanol 75 % em água-DEPC. O sobrenadante foi retirado por inversão, e após a secagem do *pellet* este foi ressuspendido em 15 a 20 µl de água-DEPC e armazenado a -20 °C.

Para cada reação de transcriptase reversa, para a obtenção do cDNA a partir do RNA do HRSV, foram utilizados 5µg do RNA total obtido pela extração com trizol. O procedimento foi segundo as especificações do fabricante do kit utilizado (SuperScript III Reverse Transcriptase Invitrogen ®). Foram misturados 2 pmol do *primer* específico para o gene, 5 µg de RNA total, 1 µl de 10 mM de dNTP e o volume completado para 13 µl com água-DEPC. A mistura foi aquecida durante 5 min a 65 °C e incubada no gelo por 1 min. A seguir foram adicionados 4 µl de tampão 5 x First Strand Buffer, 1 µl de 0.1 M de DTT e 1 µl da enzima Super Script, para cada reação. A mistura foi incubada a 55 °C por 60 min e a reação inativada a 70 °C por 15 min.

Para a realização da quantificação viral pelo método de qPCR- Real time utilizamos como alvo o gene N, e os *primers* utilizados para esse gene, caracterizados anteriormente (Dewhurst-Maridor et al., 2004), estão apresentados no quadro 2. Antes de solicitar a síntese,

os *primers* foram analisados juntamente com a sequência do gene N da cepa A2, utilizando o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* © 1999-2011 (Hall, 1999) para verificar se não haviam diferenças. Foi utilizado o *primer forward* RSV F (quadro 2) para a realização da transcrição reversa.

Quadro 2 – Oligonucleotídeos para detecção do gene N por *Real Time* qPCR.

Gene N	Primer	Posição
RSV F	5_-AGG ATT GTT TAT GAA TGC CTA TGG T	747–771
RSV R	5_-GCT TTT GGG TTG TTC AAT ATA TGG TAG	915–941

Para a realização da técnica de *Real Time* qPCR nós utilizamos o reagente SYBR Green (Applied Biosystem ®): 12,5 µl de SYBR Green, 1 µl de primer forward, 1 µl de primer reverse, 100 ng de cDNA e o volume completado para 25 µl com água-DEPC. O aparelho utilizado para a realização da técnica foi o *Applied Biosystems 7500/7500* Fast Real-Time PCR System. As análises foram feitas por *Absolute Quantification* – (Applied Biosystem ®):

3.10.8 Histologia

Um dos pulmões de cada animal dos grupos que foram imunizados com pShuttleNopt, pShuttlePopt, pShuttle, ou com as proteínas MBP-N, MBP-P ou MBP, além do controle negativo, foi retirado e deixado por um dia em paraformaldeído 4 % e estocado em etanol 70 %. Foi contratado serviço terceirizado para fazer o emblocamento em parafina, os cortes histológicos e a montagem das lâminas incluindo coloração por hematoxilina e eosina. Para análise do grau de infiltrados linfocitários e inflamação, contratamos um serviço de patologia ao qual foram entregues as lâminas marcadas por códigos.

4 RESULTADOS

4.1 Interação entre proteínas celulares e proteínas virais expressas por transfecção

Com os resultados apresentados a seguir buscamos apresentar evidências das interações das proteínas N, P e M do HRSV com as proteínas celulares identificadas por espectrometria de massas, conforme exposto na Introdução desta Tese (Tabela 1, item 1.9).

4.1.1 Co-imunoprecipitação de proteínas celulares com proteínas virais

A primeira abordagem que utilizamos foi confirmar a identidade das proteínas co-imunoprecipitadas com anticorpos específicos. Para tanto, foram feitas imunoprecipitações com anticorpo anti-FLAG das proteínas virais em fusão com o peptídeo FLAG, expressas pela transfecção de células HEK-293T com os plasmídeos pFLAG-N, pFLAG-P, pFLAG-M ou pFLAG (Ver Material e Métodos item 3.2). Isso permite verificar se há co-imunoprecipitação das proteínas celulares, pela análise por *Western Blotting* (ver item 3.7). Utilizamos como anticorpos secundários: anti-Hsp70, anti-NPM, anti-WDR77, anti-PRMT-5 ou anti-TPM, disponíveis comercialmente (Ver Material e Métodos item 3.8). Os resultados apresentados a seguir contem uma região selecionada dos autorradiogramas para facilidade de visualização, as figuras completas estão disponíveis no Apêndice.

Para a detecção da proteína celular Hsp70 foi realizado *Western Blotting* com anticorpo anti-Hsp70 após a imunoprecipitação com o anticorpo anti-FLAG. O resultado apresentado à Figura 14 indica que a proteína Hsp70 foi co-imunoprecipitada com as proteínas N e P.

Figura 14 – Co-imunoprecipitação da proteína Hsp70.

Está apresentado *Western Blotting* da imunoprecipitação com anti-FLAG e detecção com anticorpo monoclonal anti-Hsp70. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos indicados a seguir e coletadas após 48hs. 1 - pcDNA-FLAG N; 2 - pcDNA-FLAG P; 3 - pcDNA-FLAG M; e 4- pcDNA-FLAG.

Fonte: Oliveira et al. (2013).

Para a detecção da proteína celular Nucleofosmina (NPM) foi realizado *Western Blotting* com anticorpo anti-NPM após a imunoprecipitação com o anticorpo anti-FLAG. O resultado apresentado à Figura 15 indica que a proteína NPM foi co-imunoprecipitada apenas com a proteína M.

Figura 15 – Co-imunoprecipitação da proteína NPM.

Está apresentado *Western Blotting* da imunoprecipitação com anti-FLAG e detecção com anticorpo monoclonal anti-NPM. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos indicados a seguir e coletadas após 48hs. 1 - pcDNA-FLAG M; 2 - pcDNA-FLAG N; 3 - pcDNA-FLAG P; e 4 - pcDNA-FLAG.
Fonte: Oliveira et al. (2013).

Para a detecção da proteína celular WDR77, gene Mep50, foi realizado *Western Blotting* com anticorpo anti-WDR77 após a imunoprecipitação com o anticorpo anti-FLAG. O resultado apresentado à Figura 16 indica que a proteína WDR77 foi co-imunoprecipitada apenas com a proteína N.

Figura 16 – Co-imunoprecipitação da proteína WDR77.

Está apresentado *Western Blotting* da imunoprecipitação com anti-FLAG e detecção com anticorpo monoclonal anti-WDR77. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos indicados a seguir e coletadas após 48hs. 1 - pcDNA-FLAG N; 2 - pcDNA-FLAG P; 3 - pcDNA-FLAG M; 4- pcDNA-FLAG.
Fonte: Oliveira et al. (2013).

Para a detecção da proteína celular PRMT-5, foi realizado *Western Blotting* com anticorpo anti-PRMT-5 após a imunoprecipitação com o anticorpo anti-FLAG. O resultado apresentado à Figura 17 indica que a proteína PRMT-5 foi co-imunoprecipitada apenas com a proteína N.

Figura 17 – Co-imunoprecipitação da proteína PRMT-5.

Está apresentado *Western Blotting* da imunoprecipitação com anti-FLAG e detecção com anticorpo monoclonal anti-PRMT-5. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos indicados a seguir e coletadas após 48hs. 1 - pcDNA-FLAG N; 2 - pcDNA-FLAG P; 3 - pcDNA-FLAG M; 4- pcDNA-FLAG.

Fonte: Oliveira et al. (2013).

Para a detecção da proteína celular tropomiosina TPM foi realizado *Western Blotting* com anticorpo anti-TPM após a imunoprecipitação com o anticorpo anti-FLAG. O resultado apresentado à Figura 18 indica que a proteína TPM foi co-imunoprecipitada com as proteínas M e possivelmente com P.

Figura 18 – Co-imunoprecipitação da proteína TPM.

Está apresentado *Western Blotting* da imunoprecipitação com anti-FLAG e detecção com anticorpo monoclonal anti-TPM. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos indicados a seguir e coletadas após 48hs. 1 - pcDNA-FLAG ; 2 - pcDNA-FLAG M; 3 - pcDNA-FLAG P; e 4- pcDNA-FLAG N.

Fonte: Oliveira et al. (2013).

4.1.2 Co-imunoprecipitação de proteínas virais com proteínas celulares

Chamamos a essa contra prova de interação de “co-imunoprecipitação reversa”. Para tanto, é feita a imunoprecipitação com os anticorpos anti-WDR77, anti-NPM, anti-HSP70 ou anti-TPM em extrato de proteínas de HEK-293T transfectadas com os plasmídeos pcDNA-3FLAG-N, FLAG-P, FLAG-M ou FLAG. Segue-se a análise por *Western Blotting* com os anticorpos anti-FLAG, anti-M, anti-N ou anti-P (ver item 3.8) para detecção das proteínas virais. Nesta abordagem não foi detectada a co-imunoprecipitação de N com PRMT5 (resultado não apresentado), o que será comentado adiante (item 4.3).

Utilizamos o anticorpo anti-Hsp70 na imunoprecipitação seguida de detecção com anticorpo anti-Flag. Na Figura 19 está apresentada a detecção das proteínas N e P através da técnica de *Western Blotting*.

Figura 19 - Co-imunoprecipitação das proteínas virais N e P.

Células HEK 293T foram transfectadas e coletadas após 48hs. A figura mostra o *Western Blotting* da imunoprecipitação com anticorpo anti-Hsp70 e detecção com o anticorpo anti-Flag. Extratos celulares das transfecções com: 1 - pcDNA-FLAG; 2 - pcDNA-FLAG M; 3 - pcDNA-FLAG N; 4 - pcDNA-FLAG P.

Utilizamos o anticorpo anti-NPM na imunoprecipitação seguida de detecção com anticorpo policlonal anti-M. Na Figura 20 está apresentada a detecção da proteína M através da técnica de *Western Blotting*.

Figura 20 - Co-imunoprecipitação da proteína viral M.

Células HEK 293T foram transfectadas e coletadas após 48hs. A figura mostra o *Western Blotting* da imunoprecipitação com anticorpo anti-NPM e detecção com o anticorpo policlonal anti-M. Extratos celulares das transfecções com: 1 - pcDNA-FLAG; 2 - pcDNA-FLAG N; 3 - pcDNA-FLAG M; 4 - pcDNA-FLAG P.

Utilizamos o anticorpo anti-WDR77 na imunoprecipitação seguida de detecção com anticorpo anti-FLAG. Na Figura 21 está apresentada a detecção da proteína N através da técnica de *Western Blotting*.

Figura 21 - Co-imunoprecipitação da proteína N.

Western Blotting da imunoprecipitação com anti-WDR77, analisado com o anticorpo anti-FLAG. Extratos celulares das transfecções com: 1 - pcDNA-FLAG M; 2 - pcDNA-FLAG N; 3 - pcDNA-FLAG P; 4 - pcDNA-FLAG.

Utilizamos o anticorpo anti-TPM na imunoprecipitação seguida de detecção com anticorpo anti-FLAG. Na Figura 22 está apresentada a detecção da proteína M e possivelmente P através da técnica de *Western Blotting*.

Figura 22 - Co-imunoprecipitação da proteína M.

Western Blotting da imunoprecipitação com anti-TPM, analisado com o anticorpo anti-FLAG. Extratos celulares das transfecções com: 1 - pcDNA-FLAG M; 2 - pcDNA-FLAG N; 3 - pcDNA-FLAG P. 4 - pcDNA-FLAG.

4.2 Interação entre proteínas celulares e proteínas virais expressas por infecção

Para consolidar as observações relatadas até aqui, resolvemos verificar se as interações também são detectadas no contexto da infecção viral. Para tanto, células HEK293T (confluência entre 50-70%) foram infectadas ou não com HRSV. Após 24 hs foi obtido lisado celular e realizado o protocolo de imunoprecipitação nas células infectadas. Para a imunoprecipitação dos extratos de células infectadas com HRSV foram utilizados os anticorpos contra as proteínas celulares (anti-WDR77, NPM, Hsp70 ou TM) e feita a detecção das proteínas virais por *Western Blotting* com anticorpos obtidos no laboratório contra as proteínas virais N, P e M (ver item 3.8). Nesta abordagem também não foi detectada a co-imunoprecipitação de N com PRMT5 (resultado não apresentado), o que será comentado adiante (item 4.3).

A imunoprecipitação da proteína celular Hsp70 em células infectadas com HRSV, foi seguida da detecção com anticorpos policlonais anti-N, anti-P e anti-M. Os resultados apresentados abaixo (três figuras seguintes) confirmam o recrutamento da proteína Hsp70 pelas proteínas do nucleocapsídeo N e P (Figuras 23 e 24). Também foi observado que não há interação da proteína Hsp70 com a proteína M, indicando a especificidade das interações (Figura 25).

Figura 23 - Co-imunoprecipitação da proteína N com Hsp70.

Western Blotting da imunoprecipitação com anti-HSP70, analisado com o anticorpo policlonal anti-N. 1 – Extrato de células HEK293T infectadas com HRSV. 2 – Extrato de células não infectadas.

Fonte: Oliveira et al. (2013).

Figura 24 - Co-imunoprecipitação da proteína P com Hsp70.

Western Blotting da imunoprecipitação com anti-HSP70, analisado com o anticorpo policlonal anti-P. 1 – Extrato de células HEK293T infectadas com HRSV. 2 – Extrato de células não infectadas.

Fonte: Oliveira et al. (2013).

Figura 25 - Co-imunoprecipitação da proteína M com Hsp70.

Western Blotting da imunoprecipitação com anti-HSP70, analisado com o anticorpo policlonal anti-M. 1 – Extrato de células HEK293T infectadas com HRSV. 2 – Extrato de células não infectadas. A proteína M deveria ser detectada na altura de 32 kDa.

Para a imunoprecipitação da proteína celular NPM em situação infectante foi utilizado o anticorpo anti-NPM, seguindo-se a detecção com anticorpo policlonal anti-M (item 3.8). Na Figura 26 está apresentada a detecção da proteína M através da técnica de *Western Blotting*.

Figura 26 - Co-imunoprecipitação da proteína M com NPM

Western Blotting da imunoprecipitação com anticorpo anti-NPM, e detecção com anti-M. 1 – Extrato de células HEK293T infectadas com HRSV. 2 – Extrato de células não infectadas. Fonte: Oliveira et al. (2013).

A imunoprecipitação da proteína celular WDR77 (gene Mep 50) durante a infecção viral com anticorpo anti-WDR77 foi seguida de detecção com anticorpo policlonal anti-N (item 3.8). Na Figura 27 está apresentada a detecção da proteína N através da técnica de *Western Blotting* indicando que a proteína viral N está interagindo com a proteína celular WDR77.

Figura 27 - Co-imunoprecipitação da proteína N com WDR77.

Western Blotting da imunoprecipitação com anti-WDR77, analisado com o anticorpo policlonal anti-N. 1 – Extrato de células HEK293T infectadas com HRSV. 2 – Extrato de células não infectadas. Fonte: Oliveira et al. (2013).

Para a imunoprecipitação da proteína celular TPM em situação infectante foi utilizado anticorpo anti-TPM na imunoprecipitação, seguida de detecção com os anticorpos policlonal anti-M ou anti-P (item 3.8). Nas Figuras 28 e 29 está apresentada a detecção das proteínas M e P, respectivamente, através da técnica de *Western Blotting* indicando que estão interagindo com a proteína celular TPM.

Figura 28 - Co-imunoprecipitação da proteína M com TPM.

Western Blotting da imunoprecipitação com anti-TPM, analisado com o anticorpo policlonal anti-M. 1 – Extrato de células HEK293T infectadas com HRSV. 2 – Extrato de células não infectadas.

Fonte: Oliveira et al. (2013).

Figura 29 - Co-imunoprecipitação da proteína P com TPM.

Western Blotting da imunoprecipitação com anti-TPM, analisado com o anticorpo policlonal anti-P. 1 – Extrato de células HEK293T infectadas com HRSV. 2 - Extrato de células não infectadas.

Fonte: Oliveira et al. (2013).

4.3 Associação entre as proteínas celulares WDR77 e PRMT5 em células HEK293

Não pudemos detectar N na co-imunoprecipitação com o anticorpo anti-PRMT-5 tanto na interação com N transfectada como no contexto de infecção (resultados não apresentados), porém detectamos PRMT-5 co-imunoprecipitada com a proteína N (Figura 17). Assim decidimos investigar a interação entre PRMT-5 e WDR77 nas HEK293T, e verificar se nessas células elas também formam um complexo do metilossomo (Friesen et al., 2002). Caso esse complexo seja formado, como esperado pelos dados da literatura, explicaríamos os resultados obtidos pela interação sequencial N/WDR77/ PRMT-5, indicando que anticorpo anti-PRMT5 utilizado não co-imunoprecipita WDR77.

Para confirmar a interação WDR77/ PRMT-5 em HEK293T, foi utilizado o anticorpo anti-WDR77 na imunoprecipitação de extratos dessas células transfectadas com FLAG-N, FLAG-P, FLAG-M e FLAG, para simular nossas condições experimentais. Na figura abaixo está apresentada a detecção da proteína PRMT-5 através da técnica de *Western Blotting*, independentemente da proteína viral que está expressa.

Figura 30 - Co-imunoprecipitação da proteína PRMT-5.

Está apresentado *Western Blotting* da imunoprecipitação com anti-WDR77 e detecção com anticorpo monoclonal anti-PRMT5. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos indicados a seguir e coletadas após 48hs. 1 - pcDNA-FLAG N; 2 - pcDNA-FLAG P; 3 - pcDNA-FLAG M; 4- pcDNA-FLAG.

Fonte: Oliveira et al. (2013).

4.4 Definição de qual gene selecionar para estudo detalhado de interação

O conjunto de dados até aqui apresentado foi submetido à publicação (Oliveira et al., 2013), e os objetivos subsequentes foram de fazer estudos mais detalhados sobre essas interações entre proteínas virais e celulares. Para tanto, é necessário ter os clones dos genes celulares identificados. No trabalho anterior do laboratório, a partir dos dados de espectrometria de massas, foram obtidos os números de acesso do Uniprot (<http://www.uniprot.org/>): HSP70 = P08107; PRMT5 = O14744; NPM = P06748; MEP50 (WRD77) = Q9BQA1; TPM3 = P06753 (Simabuco, 2009; Tamura, 2009). Foram determinadas as sequências canônicas desses genes, tendo sido adquirido apenas o clone de cDNA da Hsp70 humana, da empresa Origene (clone sc116766 da variante Hsp70 1A), para o trabalho do Dr. Simabuco, que não teve continuidade naquele momento. Assim, já dispúnhamos de um clone e das sequências dos demais.

Com o início de uma colaboração entre os grupos do Dr. Ventura e do Dr. Éleouët do Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) na França, tivemos a possibilidade de utilizar abordagens que vinham sendo aplicadas naquele laboratório no estudo de interações

entre as proteínas virais (Tran et al., 2007; Tran et al., 2009). O Dr. Ventura acabou indo ao INRA por um curto período e deu início à abordagem com Hsp70, pelo fato de já termos o clone. Algum tempo depois, eu fui para um estágio mais longo, de seis meses, possibilitado pela bolsa FAPESP.

Para a execução das abordagens desenvolvidas pelo grupo do Dr. Eleouet é necessário expressar as proteínas interagentes em bactérias. Assim, chegou-se à conclusão de que o melhor caminho seria solicitar a síntese de genes com códons otimizados para expressão em bactérias. Isso foi feito junto à empresa GeneArt para os cinco genes celulares (inclusive Hsp70) utilizando as sequências canônicas de aminoácidos comentadas acima. Solicitou-se a síntese dos genes todos flanqueados pelos sítios de restrição para *BamHI* e *XhoI* (item 3.9.1). Levamos esses genes, e o clone de Hsp70 humano (Origene) para o estágio no laboratório do Dr. Eleouet no INRA. Os resultados lá produzidos estão apresentados a seguir, incluindo até o item 4.8.

4.4.1 Clonagem dos genes celulares em vetores de expressão

O primeiro trabalho realizado no INRA foi a sub clonagem dos genes celulares nos vetores pET28a, pGEX-4T-3 e pcDNA3 (ver item 3.9.1) entre os sítios de *BamHI* e *XhoI*. Não apresentaremos os dados da obtenção dos plasmídeos, estando os procedimentos descritos nos itens 3.9.1 a 3.9.7. A título ilustrativo da estrutura apresentamos às Figuras 31, 32 e 33 os esquemas dos vetores pET28a, pGEX-4T-3 e pcDNA3 com a Hsp70 clonanda. O resultado final foram quinze plasmídeos listados a seguir com o seu tamanho em pares de bases indicado: pET 28 a+ Hsp70 (7.549 pb), pET 28 a+ Nucleofosmina (6.324 pb), pET 28 a+ PRMT5 (7.341 pb), pET 28 a+ TM (6.297 pb), pET 28 a+ WDR77 (6.468 pb), pGex-Hsp70 (6.969 pb), pGex-Nucleofosmina (5.940 pb), pGex-PRMT5 (6.957 pb), pGex-WDR77 (6.084 pb), pGex-TM (5.913 pb), pcDNA 3 Hsp70 (7.406 pb), pcDNA Nucleofosmina (6.377 pb), pcDNA 3 PRMT5 (7.394 pb), pcDNA 3 TM (6.350 pb), pcDNA 3 WDR77 (6.521 pb).

Figura 31- Esquema do vetor pET 28 a+ Hsp70.

Figura 32- Esquema do vetor pGex-Hsp70.

Figura 33- Esquema do vetor pcDNA 3 Hsp70.

Na construção do pcDNA 3 Hsp70, como é um vetor para expressão em células de mamífero, utilizamos o gene humano adquirido da Origene, as demais construções foram com os genes otimizados encomendados à GeneArt (ver item 3.9.1). Com esse conjunto de vetores fizemos alguns experimentos piloto e logo ficou claro que o volume de trabalho para o estudo concomitante dos cinco genes seria muito grande. Dessa forma decidimos selecionar a Hsp70 para focar nossos esforços e conseguir dados mais significativos no tempo de doutorado que nos restava. Pesaram nesta decisão a experiência do grupo do Dr. Éleouët no estudo das interações entre N e P (ver item 1.10.4) que verificamos interagir com N e P (itens 4.1 a 4.3), e os dados da literatura com maior volume de evidências da Hsp70 participando de processos de replicação viral (ver item 1.10.5).

Apresentamos nos próximos dois itens apenas dois desses experimentos piloto. No item 4.4.2 temos um exemplo da funcionalidade dos vetores construídos, e no 4.4.3 a confirmação das interações de tropomiosina que tem grande potencial para gerar dados interessantes.

4.4.2 Expressão e purificação de proteínas celulares em fusão com GST

Para a expressão das proteínas GST-NPM, GST-TM, GST-WDR77, GST-PRTM-5, bactérias *E.coli* BL21 pLys foram transformadas com os plasmídeos pGex-NPM, pGex-TM, pGex-WDR77, pGex-PRMT-5 (ver item 3.9.8). Após a indução, *overnight*, a 28°C, as bactérias foram centrifugadas e do *pellet* foi feita a purificação das proteínas utilizando o protocolo de purificação com *GS-beads* (ver item 3.9.9). Na Figura 34 as bandas apontadas por setas em vermelho correspondem ao tamanho esperado como descrito na legenda, indicando a funcionalidade desses vetores.

Figura 34 - Purificação de proteínas celulares em fusão com GST.

Está apresentado gel de poliacrilamida 12% corado com *Coomassie Blue* das proteínas purificadas. Após os procedimentos descritos nos itens 3.9.8 e 3.9.9, foi feita a análise das proteínas indicadas a seguir (setas vermelhas). 1- Marcador molecular Page RulerTM Prestained Protein Ladder; 2- GST-TM (67 kDa); 3- GST-NPM (67kDa); 4- GST-WDR77 (70kDa); 5-GST-PRMT5 (97kDa).

4.4.3 Estudo das Interações por co-expressão em bactérias entre tropomiosina e as proteínas virais P ou M

Nesse experimento bactérias *E.coli BL21 pLys* foram transformadas utilizando os plasmídeos pGex-TM junto com pET-P ou pGex-TM junto com pET-M. E purificadas utilizando *GS-beads* (ver item 3.9.9). Observamos que ocorre o *pull down* de P (canaleta 2 da Figura 35A) e de M (canaletas 2 e 3 da Figura 35B) com GST-TPM. Assim, podemos afirmar que está ocorrendo interação entre TM e P, e também uma fraca interação entre TM com M.

Figura 35 – Detecção da interação entre a proteína TM e P ou M.

Após os procedimentos descritos no item 3.9.11, foi feita a análise das proteínas em gel de poliacrilamida 12%. Está apresentado o gel das proteínas purificadas corado com *Coomassie Blue*. A) 1 - Marcador molecular Page Ruler™ Prestained Protein Ladder; 2- Co-expressão de pGex-TM com pET- P. B) 1 - Marcador molecular Page Ruler™ Prestained Protein Ladder; 2 e 3- Co-expressão de pGex-TM com pET- M. As posições de migração das proteínas GST-TPM, P-His e M-His estão indicadas à direita dos géis por setas vermelhas.

4.5 Estudo das Interações por co-expressão em bactérias entre Hsp70 e N ou P

4.5.1 Co-expressão das proteínas Hsp70 e N e purificação com GS-beads

Para confirmar a interação da proteína celular Hsp70 com a proteína viral N, foram feitas co-expressões dessas duas proteínas em bactérias *E.coli* BL21 pLys utilizando duas diferentes combinações plasmidiais: pGex-Hsp70 com pET-N ou pET-Hsp70 com pGex-N (item 3.9.11). No gel apresentado à Figura 36 podemos ver que às canaletas 2 e 3 é detectada a co-purificação de N com GST-Hsp70, e à canaleta 8 de Hsp70 com GST-N. Isso indica que a interação entre N e Hsp70 é independente da combinação das proteínas de fusão utilizadas. No entanto, a interação entre as proteínas Hsp70-His (pET-Hsp70) e GST-N (pGex-N), canaleta 8, é muito mais forte (bandas com a mesma proporção de intensidade) quando comparada com a interação entre N-His (pET-Hsp70) e GST-Hsp70. Aparentemente a presença da GST na posição do N-terminal da proteína Hsp70 está atrapalhando essa interação.

Neste experimento foi testado se mutantes da proteína N com deleções em diferentes regiões (plasmídeos listados no item 3.9.1) interagem com a proteína Hsp70. Também foi testado o mutante N-R132A, cuja troca de aminoácidos faz com que perca a interação com a

proteína P (Galloux et al., 2012). À Figura 36 podemos observar que os mutantes N (1-252) e N (31-252) interagem com a proteína Hsp70. Já o mutante N (252-391) não interage. Outro dado observado nesse resultado é que o mutante N-R132A interage com a proteína Hsp70. Assim temos uma indicação de que a proteína celular Hsp70 e a Fosfoproteína do HRSV não competem pela mesma região que promove a interação entre N e P.

Figura 36 - Detecção da interação entre a proteína Hsp70 e a proteína N.

Após os procedimentos descritos no item 3.9.11, foi feita a análise das proteínas em gel de poliacrilamida 12%. Está apresentado o gel das proteínas purificadas corado com *Coomassie Blue*. Canaletas: 1 - Marcador molecular Page Ruler™ Prestained Protein Ladder; 2- Co-expressão do pGex-Hsp70 com pET-N; 3- Co-expressão do pGex-Hsp70 com pET-N; 4- Marcador molecular Page Ruler™ Prestained Protein Ladder; 5- Co-expressão do pGex-Hsp70 com pET-N (1-252); 6- Co-expressão do pGex-Hsp70 com pET-N (31-252); 7 - Co-expressão do pGex-Hsp70 com pET-N (252-391); 8 - Co-expressão pET-Hsp70 com pGex-N; 9- Co-expressão do pGex-Hsp70 com pET-N R132A.

Para ter certeza de que a proteína viral N liga-se a Hsp70 e não a GST, foram feitas co-expressões entre a GST e as proteínas virais N e N°, utilizando os plasmídeos pGex-4T-3 com pET-N ou pET- N° (item 3.9.1). É possível observar que não ocorre interação entre GST e N ou N° Figura 37 (canaletas 3 e 4, respectivamente). N° é um mutante que não se complexa a RNA (Galloux et al., 2012) e neste experimento verificamos sua interação com Hsp70 (canaleta 6).

Figura 37 - A proteína N não interage com GST.

Após os procedimentos descritos no item 3.9.11, foi feita a análise das proteínas em gel de poliacrilamida 12%. Está apresentado o gel das proteínas purificadas corado com *Coomassie Blue*. Canaletas: 1 - Marcador molecular Page Ruler™ Prestained Protein Ladder; 2- Expressão de pGex-4T-3; 3- Co-expressão do pGex-4T-3 com pET-N; 4- Co-expressão do pGex-4T-3 com pET-Nº; 5- Co-expressão do pGex-Hsp70 com pET-N; 6- Co-expressão do pGex-Hsp70 com pET- Nº.

4.5.2 Co-expressão das proteínas Hsp70 e P e purificação com GS-beads

Para confirmar a interação da proteína celular Hsp70 com a proteína viral P, foram feitas co-expressões dessas duas proteínas em bactérias *E.coli* BL21 pLys utilizando duas combinações de plasmídeos: pGex-Hsp70 com pET-P ou pET-Hsp70 com pGex-P. No resultado apresentado à Figura 38 é possível observar que a proteína Hsp70 interage com a proteína P independente da combinação (canaletas 2 e 7). No entanto, a interação entre as proteínas His-Hsp70 e GST-P (canaleta 2) é muito mais intensa quando comparada com a interação entre as proteínas GST-Hsp70 e His-P (canaleta 7). Como observado para N no item anterior, essa fraca interação provavelmente está acontecendo devido a presença da proteína GST no N-terminal da proteína Hsp70.

Neste experimento também foi testado se mutantes da proteína P com deleções em diferentes regiões (plasmídeos listados no item 3.9.1) interagem com a proteína Hsp70. À Figura 38 vemos que a Hsp70 interage fortemente com os quatro mutantes testados nesse experimento: P (1-163); P (127-241); P (127-205); P (1-126). Além disso, testamos se o domínio central da proteína P (120-160) ligado à GST também é capaz de interagir com

Hsp70 (canaleta 8). O resultado indica que esse domínio, responsável pela oligomerização de P (ver item 1.10.3), liga-se muito fracamente à Hsp70.

Figura 38 - Detecção da interação entre a proteína Hsp70 e a proteína P.

Após os procedimentos descritos no item 3.9.11, foi feita a análise das proteínas em gel de poliacrilamida 12%. Está apresentado o gel das proteínas purificadas corado com *Coomassie Blue*. Canaletas: 1 - marcador Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder; 2 - Co-expressão dos plasmídeos pET Hsp70 e pGex-P; 3- Co-expressão do pET-Hsp70 e pGex-P (1-163); 4- Co-expressão do pET-Hsp70 e pGex-P (127-241); 5- Co-expressão do pET-Hsp70 e pGex-P (127-205); 6- Co-expressão do pET-Hsp70 e pGex-P (1-126); 7- Co-expressão do pET-P e pGex-Hsp70. 8- Marcador molecular Page Ruler™ Prestained Protein Ladder; 9 - Co-expressão de pET- Hsp70 + pGEX- P (120-160).

Para confirmar se de fato a proteína Hsp70 interage com a proteína P e não com a proteína GST, bactérias *E.coli* BL21 pLys foram transformadas com os plasmídeos pET-Hsp70 e pGex-P. As proteínas foram purificadas com *GS-beads*, e feita a clivagem com trombina cujo sítio está entre a GST e a proteína P. Amostras das diferentes etapas foram analisadas separadamente em gel de SDS: *GS-beads* antes da clivagem, *GS-beads* após a clivagem e sobrenadante após clivagem. Os resultados à Figura 39 mostram que a proteína P continua interagindo com a proteína Hsp70 mesmo depois da clivagem com trombina (canaleta 4), não havendo retenção aparente junto à GST.

Figura 39 - A proteína P não interage com GST.

Gel de poliacrilamida 12% corado com *Coomassie Blue*. Canaleta 1 - Marcador molecular Page Ruler™ Prestained Protein Ladder; 2- Hsp70 + GST-P Beads antes da clivagem; 3- Hsp70 + GST- P Beads depois da clivagem; 4- Hsp70 + GST-P Sobrenadante.

4.6 Estudo das Interações *in vitro* entre Hsp70 e proteínas virais

Após obter evidências das interações em co-expressão em bactérias o estudo deve ser aprimorado pela demonstração dessas interações *in vitro* entre as proteínas purificadas. As duas metodologias que utilizamos baseiam-se na purificação seguida de ensaios em solução, a técnica de RMN e o *pull down* seguido de detecção.

4.6.1 Purificação da proteína Hsp70 utilizando a técnica de Gel-Filtração

Utilizamos a técnica de gel-filtração após a primeira purificação por *GS-beads*, com o propósito de obter uma purificação de maior grau dos polipeptídeos Hsp70 e N_{NTD} (domínio amino terminal de N) com a finalidade de realizar os experimentos de interação utilizando a técnica de RNM. Primeiramente foi necessário produzir grande quantidade de proteína, para isso foram preparados 2 L de cultura de bactérias transformadas com o plasmídeo pGex-Hsp70, seguindo-se os procedimentos dos itens 3.9.8 e 3.9.9. A proteína de fusão GST-Hsp70 foi então clivada com trombina, sendo esta retirada da solução (ver item 3.9.12). Com a proteína Hsp70 parcialmente purificada cada metade da preparação foi incubada com 1 mM de ATP ou com 1 mM de ADP *overnight* a T.A. e então feita a gel-filtração (ver item 3.9.13).

Este procedimento foi adotado devido à constatação de que a presença de ATP aumenta a afinidade de Hsp70 por peptídeos (Mayer et al., 2000; Schmid et al., 1994). O

gráfico à Figura 40 mostra a purificação da Hsp70 após incubação com ATP. Os picos circundados em vermelho mostram as diversas frações onde essa proteína está presente. No gel de SDS à Figura 41 está mostrada a detecção da proteína Hsp70 a partir de algumas frações provenientes da gel-filtração. Em cada canaleta está mostrada uma fração da purificação da proteína Hsp70 (Frações de 5-12) correspondente a região do gráfico circundada em vermelho. Também foram analisadas as frações de 22 a 26 para saber se ainda restava proteína nessas amostras.

No gráfico à Figura 42 está mostrada a purificação da proteína Hsp70 após a incubação com ADP, dessa vez somente dois picos foram observados e as frações das proteínas correspondentes a esses picos foram analisadas em gel de SDS, Figura 43.

Como nessas duas tentativas de purificação da proteína foram obtidos vários picos, o que é indesejável para a gel-filtração, o experimento foi refeito, porém dessa vez sem a incubação com ATP ou ADP. No gráfico da Figura 44 é possível observar apenas um pico que corresponde à purificação da proteína Hsp70 indicando que a purificação foi de qualidade, circundado em vermelho. As frações correspondentes a esse pico foram analisadas em gel de SDS, Figura 45.

Figura 40 - Gráfico de gel-filtração da proteína Hsp70 após incubação com ATP.

Figura 41 – Análise da gel-filtração da proteína Hsp70 após incubação com ATP.

Gel de poliácridamida 12% corado com *Coomassie Blue*. Canaleta M - Marcador molecular Page RulerTM Prestained Protein Ladder. Em cada canaleta está mostrada uma fração da purificação da proteína Hsp70 (Frações de 5-12) correspondente a região do gráfico à Figura 40 circundada em vermelho. Também foram analisadas as frações de 22 a 26.

Figura 42- Gráfico de gel-filtração da proteína Hsp70 após incubação com ADP.

Figura 43- Análise da gel-Filtração da proteína Hsp70 após incubação com ADP.

Gel de poliacrilamida 12% corado com *Coomassie Blue*. Canaleta M - Marcador molecular Page Ruler™ Prestained Protein Ladder. Em cada canaleta está mostrada uma diferente fração da purificação da proteína Hsp70 (Frações de 13-21) correspondente as duas regiões do gráfico à Figura 42 circundadas em vermelho.

Figura 44 - Gráfico de gel-filtração da proteína Hsp70.

Figura 45 - Análise da gel-filtração da proteína Hsp70.

Gel de poliacrilamida 12% corado com *Coomassie Blue*. Canaleta M - Marcador molecular Page RulerTM Prestained Protein Ladder. Em cada canaleta está mostrada uma diferente fração da purificação da proteína Hsp70 (Frações de 9-19) correspondente à região do gráfico à Figura 44 circundada em vermelho.

As diversas bandas contaminantes que aparecem no gel (Figura 45), possivelmente são de proteínas que podem estar sendo co-purificadas com Hsp70 presas dentro do PBD (*peptide binding domain*). Foram selecionadas frações com menor proporção de contaminantes para serem utilizadas nos experimentos de interação.

4.6.2 Análise da interação entre Hsp70 e o amino terminal de N por RMN

A proteína purificada (Figura 44) foi levada ao *Institut de Chimie des Substances Naturelles*, CNRS, onde a Dra. Cristina Sizun realizou e analisou os experimentos utilizando a técnica de RMN. A presença de ATP deixa a proteína Hsp70 no estado conformacional “aberto” e a presença de ADP no estado conformacional “fechado”. Assim, na presença de ATP seria possível observar uma forte interação entre Hsp70 e N_{NTD}, pela técnica de RMN.

Para a realização do experimento de RNM, foram preparadas duas amostras: uma com apenas N_{NTD} (produzido no próprio CNRS descrito no item 3.9.14) e outra na presença de Hsp70 com Mg e ATP, e feito o procedimento de análise (ver item 3.9.14). No gráfico da Figura 46 é possível observar que na presença de Hsp70, o N_{NTD} está sendo degradado e possivelmente essa degradação está acontecendo com a forma complexada entre Hsp70 e N_{NTD}. É possível ver essa degradação pelos novos picos, circundados em vermelho. Apesar disso, este resultado é um indicativo de interação. Posteriormente, verificamos em dados da

literatura que faltou a adição de um parceiro da Hsp70, ou co-chaperona, a Hsp40, como será detalhado na discussão.

Figura 46 - Interação entre N_{NTD} e Hsp70.

Gráfico de Ressonância Nuclear Magnética. Em preto, está a amostra somente com N_{NTD} e em azul, N_{NTD} com Hsp70.

4.6.3 Interação da proteína Hsp70 purificada com as proteínas virais N, N_{NTD} , N° M2-1 e M

Frações das três purificações da proteína Hsp70 (Figuras 40, 42 e 44) foram utilizadas nos experimentos a seguir, para observar se ocorre interação com as proteínas virais. Essas frações de purificação, indicadas nas legendas das figuras, foram incubadas com as proteínas N, N_{NTD} , N° , M2-1 ou M ligadas a *beads* de Níquel, por 2 horas a T.A. Após esse período as *beads* foram lavadas com tampão de lise para proteínas com cauda His (item 3.9.10), fervidas com tampão Laemmli e analisadas em gel de SDS. As *beads* de Níquel após serem fervidas, e separadas das respectivas proteínas, não foram adicionadas no gel. Nas Figuras 47, 48, 49 e 50, estão apresentados resultados indicando que a proteína Hsp70 interage com as proteínas N, N_{NTD} e N° , mas não (ou muito fracamente) com as proteínas M2-1 e M. Também é possível observar que há uma maior interação com N_{NTD} e N° do que com N.

Figura 47 - Interação da proteína Hsp70 com His-N.

Gel de poliacrilamida 12% corado com *Coomassie Blue*. Canaleta 1 - Marcador molecular Page Ruler™ Prestained Protein Ladder; Beads de His-N incubadas com: 2- Hsp70 purificada após incubação com ATP, fração 9; 3- Hsp70 purificada após incubação com ATP, fração 12; 4- Hsp70 purificada após incubação com ADP, fração 14 ; 5- Hsp70 purificada após incubação com ADP, fração 15; 6- Hsp70 purificada fração 13; 6- Hsp70 purificada fração 14.

Figura 48 - Interação da proteína Hsp70 com His-N_{NTD}.

Gel de poliacrilamida 12% corado com *Coomassie Blue*. Canaleta 1- Marcador molecular Page Ruler™ Prestained Protein Ladder; 2- Expressão da proteína His- N_{NTD}, 3- Expressão da proteína Hsp70 purificada, fração 9; 4- Expressão da proteína Hsp70 purificada, fração 12; 5- Incubação da proteína His-N_{NTD} com Hsp70 purificada, fração 9; 6- Incubação da proteína His-N_{NTD} com Hsp70 purificada, fração 12.

Figura 49 - Interação da proteína Hsp70 com His-N°.

Gel de poliacrilamida 12% corado com *Coomassie Blue*. Canaleta 1 - Marcador molecular Page Ruler™ Prestained Protein Ladder; 2- Incubação da proteína His-N° com Hsp70 purificada, fração 9.

Figura 50- Interação da proteína Hsp70 com His-M e His-M2.1.

Gel de poliacrilamida 12% corado com *Coomassie Blue*. Canaleta: 1- Incubação da proteína His-M com Hsp70 purificada, fração 13; 2- Incubação da proteína His-M com Hsp70 purificada após incubação com ADP, fração 14; 3- Incubação da proteína His-M com Hsp70 purificada após incubação com ATP, fração 9; 4- Incubação da proteína His-M2.1 com Hsp70 purificada, fração 13; 5- Incubação da proteína His-M2.1 com Hsp70 purificada, fração 14; 6- Incubação da proteína His-M2.1 com Hsp70 purificada após incubação com ADP, fração 15; 7- Incubação da proteína His-M2.1 com Hsp70 purificada após incubação com ADP, fração 14; 8- Incubação da proteína His-M2.1 com Hsp70 purificada após incubação com ATP, fração 12; 9- Incubação da proteína His-M2.1 com Hsp70 purificada após incubação com ATP, fração 9; 10 - Marcador molecular Page Ruler™ Prestained Protein Ladder.

4.7 Estudo da participação dos domínios da Hsp70 nas interações

Pelo fato do grupo do Dr. Eleouet já ter trabalhado com interações de N e P, tivemos acesso às várias construções utilizadas nos experimentos anteriores, e pudemos ter uma idéia de que domínios de N (amino terminal) e P (amino e carboxi terminais) interagem com Hsp70. A pergunta que surge então é de qual domínio da Hsp70 está sendo responsável pela interação. À Figura 8 da Introdução (item 1.10.5.1), podemos ver que pela estrutura da Hsp70 há dois grandes domínios que podem ser considerados para uma análise mais grosseira de qual região estaria interagindo com N ou P, tendo como ponto de divisão o aminoácido 384 temos os domínios C e N terminais. A expectativa inicial era de observar a interação ocorrendo no C-terminal onde está localizado o sítio de interação com os peptídeos (item 1.10.5.1).

4.7.1 Construções dos plasmídeos Hsp70 N-terminal e C-terminal separadamente

Decidimos construir os plasmídeos expressando o N-terminal e o C-terminal da Hsp70 nos vetores pGEX e pET. Às Figuras 51 e 52 temos os esquemas desses plasmídeos. Os plasmídeos contendo N-terminal foram produzidos utilizando mutagênese sítio dirigida (3.9.15) e os plasmídeos, contendo o C-terminal da Hsp70, foram construídos por sub clonagem (ver itens 3.9.2 a 3.9.7). Não apresentaremos os dados da obtenção dos plasmídeos, tendo sido feito o sequenciamento para confirmar a correta construção de todos.

Figura 51 - Esquema dos vetores pET 28 a+ Hsp70 N terminal e C terminal.

Figura 52 - Esquema dos vetores pGex-Hsp70 N terminal e C terminal.

Bactérias *E.coli* *Bl21 pLys* foram transformadas com esses plasmídeos, e a expressão das proteínas foi analisada (ver item 3.9.8). No resultado à Figura 53, as setas vermelhas indicam que as proteínas foram produzidas no peso molecular esperado.

Figura 53 – Expressão das proteínas Hsp70 N e C terminal.

Está apresentado gel de poliacrilamida 12% corado com *Coomassie Blue*. Canaletas 1 e 3 - Marcador molecular Page Ruler™ Prestained Protein Ladder. Canaletas: 2 - His-Hsp70-C-terminal; 4- His-Hsp70 N-terminal, 5- GST-Hsp70 C-terminal, 6- GST-Hsp70 N-terminal.

4.7.2 Co-expressão de GST-Hsp70 N-terminal e GST-Hsp70 C-terminal com His-N_{NTD} em bactérias

Para verificar com qual região da Hsp70 ocorria a interação com N_{NTD}, bactérias *E.coli* BL21 pLys foram transformadas com pGex-Hsp70 C-terminal ou com pGex-Hsp70 N-terminal juntamente com pET- N_{NTD}. O resultado apresentado à Figura 54 indica que ocorre interação de GST-Hsp70 N-terminal e GST-Hsp70 C-terminal com His-N_{NTD}, e que a interação de His- N_{NTD} com GST-Hsp70 N-terminal é mais intensa do que com GST-Hsp70 C-terminal, contrariando as expectativas iniciais. Consideramos que esse resultado abre novas questões e será referido na Discussão.

Figura 54 - Interação dos domínios amino ou carboxi terminais da proteína Hsp70 com N_{NTD}.

Após os procedimentos descritos no item 3.9.11, foi feita a análise das proteínas em gel de poliacrilamida 12%, apresentado após ser corado com *Coomassie Blue*. Canaleta 1 - Marcador molecular Page RulerTM Prestained Protein Ladder; 2- Co-expressão de pGex-Hsp70 N-terminal com pET- N_{NTD}; 3- Co-expressão de pGex-Hsp70 C-terminal com pET-N_{NTD}; 5- Expressão de pET-N_{NTD}.

4.8 Interferência de Hsp70 na funcionalidade do Minigenoma viral e na formação de corpúsculos de inclusão

Para verificar se há significado funcional das interações de Hsp70 com N e P, caracterizadas até aqui, lançamos mão de outra ferramenta de domínio do grupo do Dr. Éleoüet, o minigenoma (ver item 3.9.17). No sistema de minigenoma temos a expressão das proteínas virais (N, P, L e M2-1) responsáveis pelos processos de replicação e transcrição do

RNA genômico viral no citoplasma. Isso é possível porque esses genes estão clonados sob o controle da RNAPol T7 expressa nas células (no nosso caso as BSRT7/5, item 3.9.17) e presente no citoplasma. Ao serem co-transfectados os plasmídeos contendo esses genes e outro plasmídeo (o minigenoma) contendo os elementos do genoma viral controlando um gene repórter (aqui o pM-Luc, que expressa luciferase), são utilizados como molde para transcrição ao entrarem no citoplasma. Assim é possível monitorar uma replicação viral artificial pela expressão do gene repórter.

Lançamos mão de um inibidor da Hsp70 e de sua superexpressão, com o objetivo de verificar se a modulação do nível dessa proteína interfere na replicação viral. Além do minigenoma utilizamos também a co-expressão de N e P, que é suficiente para observar estruturas chamadas corpúsculos de inclusão no citoplasma celular, e perguntar se a modulação de Hsp70 também interfere na sua formação.

4.8.1 Efeito de quercetina na atividade do Minigenoma

A quercetina foi a droga utilizada para inibir Hsp70, tendo sido caracterizada anteriormente como inibidor geral de proteínas de choque térmico (Elia, Santoro, 1994). Células BSRT7/5 foram transfectadas com os plasmídeos pCITE-N, pCITE-P, pCITE-L, pCITE-M21-1, pM-Luc e pSV β gal (ver item 3.9.17), e após 4 horas as células foram incubadas ou não com quercetina Sigma-Aldrich dissolvida em DMSO (dimetil sulfóxido, Merck) nas concentrações de 200 μ M, 100 μ M e 50 μ M, ou somente DMSO nos controles. Após 24 horas as células foram incubadas por 30 minutos a 37 °C ou 43 °C, e em seguida recolhidas e feitas as medidas da atividade de luciferase/ β -gal ou *Western Blotting* (itens 3.9.18 e 3.9.20).

Nos resultados apresentados à Figura 55 foi feita a normalização da eficiência de transfecção dividindo a medida da atividade de Luciferase pela de β -gal. Observamos um aumento da atividade da Luciferase na presença do inibidor quando comparada ao grupo controle WT, especialmente a 43 °C (essa temperatura foi usada na tentativa de aumentar a expressão de Hsp70, uma vez que essa proteína é uma pertence a família das proteínas do choque térmico).

Parte das células desse experimento foi recolhida, lisada e a quantidade total de proteínas quantificada, para normalizar a aplicação no experimento de *Western Blotting* apresentado à Figura 56. Nos grupos que receberam quercetina é possível ver um aumento da expressão da proteína viral N quando comparada com os controles negativo ($\emptyset$ na legenda) e

wt, o que é coerente com o efeito estimulador da atividade de luciferase. A expressão da proteína Hsp70, no entanto, não foi significativamente alterada, como seria esperado.

Figura 55 – Efeito de quercetina sobre a atividade do minigenoma.

O gráfico mostra a atividade da Luciferase/ β -gal (eixo y) para os diferentes grupos de células após transfecção com minigenoma (eixo x). Grupos: CT neg – somente células; WT+ DMSO – Células transfectadas incubadas com DMSO; WT – Células transfectadas; Células transfectadas e incubadas com 200µM, 100µM ou 50µM de Quercetina: 200µM Qct, 100µM Qct e 50µM Qct respectivamente. O gráfico está dividido entre as células que foram submetidas a choque térmico (43°C) e as células que foram mantidas a 37°C.

Figura 56 – Análise da expressão das proteínas Hsp70 e N após tratamento com quercetina.

Está apresentado o *Western Blotting* do ensaio apresentado à Figura 55. A detecção de Hsp70 foi feita com o anticorpo monoclonal da Sigma-Aldrich ® e a detecção de N por anticorpo policlonal anti-N (ver item 3.9.18).

4.8.2 Efeito de quercetina e de superexpressão de Hsp70 na formação de corpúsculos de inclusão

Para esse experimento células BSRT7/5 foram transfectadas somente com pCITE-N e pCITE-P, 4 horas depois as células foram incubadas ou não com 200 µM de quercetina. Em outra condição as células foram transfectadas somente com 0,5 µg pCITE-N, 0,5 µg pCITE-P, e com 1 µg de pcDNA3-Hsp70, sem a presença de inibidor. Após 24 horas foi feito o procedimento de imunofluorescência (item 3.9.19), utilizando fixação com paraformaldeído, e os anticorpos anti-Hsp70 e anti-N (ver item 3.9.18).

Figura 57 – Efeito de quercetina e superexpressão de Hsp70 sobre os corpúsculos de inclusão.

Painel A - Células transfectadas com 0,5 µg pCITE-N e 0,5 µg pCITE-P; Painel B - Células transfectadas com 0,5 µg pCITE-N e 0,5 µg pCITE-P e incubadas com 200 µM de Quercetina; Painel C – Células transfectadas com 0,5 µg pCITE-N, 0,5 µg pCITE-P e 1µg de pcDNA3-Hsp70. Está apresentada imunofluorescência com anticorpos anti-N e anti-Hsp70, detectados com os conjugados anti-coelho Alexafluor-488 (verde) e anti-camundongo Alexafluor-594 (vermelho).

Na Figura 57 painel A é possível ver os corpúsculos de inclusão pela combinação das proteínas N e P do HRSV (seta branca). No painel B é possível ver que na presença da quercetina, os corpúsculos de inclusão estão com o seu tamanho aumentado (setas brancas). Já no painel C observamos que na superexpressão de Hsp70 pela transfecção do plasmídeo pcDNA3-Hsp70 (seta amarela), e os corpúsculos de inclusão estão com tamanho reduzido (seta branca). Nota-se uma coerência do aumento do diâmetro dos corpúsculos de inclusão com o aumento da expressão de N na Figura 56, pelo efeito da quercetina. O efeito dessa droga, no entanto, não correspondeu às expectativas para tiramos conclusões claras. Quanto à modulação pela superexpressão da Hsp70, outros experimentos são necessários.

4.8.3 Efeito de superexpressão de Hsp70 na atividade do Minigenoma

Para obter mais dados da superexpressão da Hsp70, células BSRT7/5 foram transfectadas em duplicata nas condições descritas à legenda da Figura 58. Após 24 horas essas células foram utilizadas para quantificação da atividade da luciferase ou imunofluorescência com detecção de N e de Hsp70. No experimento de quantificação da atividade da luciferase Figura 58 foi possível observar que os grupos que foram transfectados com Hsp70 (HSP1 e HSP2) tiveram uma maior indução da atividade do minigenoma, quando comparados com os grupos controle WT1 e WT2.

Figura 58 – Efeito da superexpressão de Hsp70 sobre a atividade do minigenoma.

O gráfico mostra os diferentes grupos de células após transfecção com minigenoma (eixo x) pela atividade da Luciferase/β-gal (eixo y). Todos os grupos foram transfectados com o conjunto de plasmídeos para observar atividade do minigenoma (ver item 3.9.17) e com: WT1- 0,5 µg pcDNA3; HSP1 - 0,5 µg pcDNA-Hsp70; WT2 - 1 µg pcDNA3; HSP2 - 1 µg pcDNA3-Hsp70.

No ensaio de imunofluorescência (fixação com metanol, ver item 3.9.18) observamos a presença da super expressão de Hsp70 em células que foram transfectadas com 1µg pcDNA3-Hsp70 (células em vermelho, Figura 59 B). Há um aparente aumento no percentual de ocorrência de corpúsculos de inclusão com relação ao controle.

Figura 59 - Efeito da superexpressão de Hsp70 sobre os corpúsculos de inclusão.

Painel A – Células tratadas como em WT2 à Figura 58; Painel B – Células tratadas como em HSP2 à Figura 58. Está apresentada imunofluorescência com anticorpos anti-N e anti-Hsp70, detectados com os conjugados anti-coelho Alexafluor-488 (verde) e anti-camundongo Alexafluor-594 (vermelho) (ver item 3.9.19).

4.8.4 Efeito de superexpressão de Hsp70 na atividade do minigenoma monitorando Hsp70 endógena

Para melhor avaliar o efeito de superexpressão de Hsp70 na atividade do minigenoma, incorporamos o monitoramento da Hsp70 endógena. Células BSRT7/5 foram divididas em 3 grupos, e transfectadas conforme descrito à legenda da Figura 60. Após 24 horas essas células foram coletadas e destinadas a quantificação da atividade de luciferase, *Western Blotting* ou imunofluorescência. No experimento da quantificação de atividade de luciferase (Figura 60) foi observado que novamente ocorreu um aumento na presença de Hsp70, grupos hsp0,5 e hsp1, quando comparados com o grupo controle (WT).

Para o experimento de *Western Blotting* (Figura 61) foram colocados 5 µg da proteína total em cada poço do gel de SDS. Foi observado um aumento gradativo da expressão de Hsp70 do controle para hsp0,5 e hsp1, como esperado. Além disso, foi observado que em hsp1 maior nível de expressão de Hsp70, as proteínas virais N, P e M2-1 sofrem uma sensível redução na sua expressão.

Figura 60 – Efeito da superexpressão de Hsp70 sobre a atividade do minigenoma.

O gráfico mostra os diferentes grupos de células após transfecção com minigenoma (eixo x) pela atividade da Luciferase/ β -gal (eixo y). Todos os grupos foram transfectados com o conjunto de plasmídeos para observar atividade do minigenoma (ver item 3.9.17), total de 1 μ g de DNA e com: WT1- 1 μ g pcDNA3; HSP0,5- 0,5 μ g pcDNA3 + 0,5 μ g pcDNA3-Hsp70; HSP1 - 1 μ g pcDNA3-Hsp70.

Figura 61 – Análise da expressão das proteínas Hsp70, Tubulina, N, P e M2.1.

Está apresentado o *Western Blotting* do ensaio de minigenoma descrito à Figura 60. 1- WT1; 2- HSP0,5; 3- HSP1. Devido ao peso molecular distinto das proteínas monitoradas a incubação primária foi com a mistura dos anticorpos contra Hsp70, tubulina, N, P e M2.1 descritos no item 3.9.18, bem como o restante dos procedimentos lá descritos.

Na análise por imunofluorescência nos restringimos à condição de maior expressão de Hsp70 (hsp1, células transfectadas com 1 μ g de minigenoma e 1 μ g de pcDNA3-Hsp70) para analisar a interação entre esta e os corpúsculos de inclusão. Também apresentaremos somente a condição de fixação com paraformaldeído, pois com metanol a análise em detalhe dos

corpúsculos de inclusão é desfavorecida. Isso se deve à associação dessas estruturas com *lipid rafts*, que são afetados pelo metanol (Brown et al, 2005^b).

Na Figura 62, Painel C indicado pelas setas brancas, é possível ver a co-localização dos corpúsculos de inclusão (anéis) com uma maior concentração da proteína Hsp70. No Painel A as setas brancas indicam os corpúsculos de inclusão, detectados com o anticorpo policlonal anti-N, e no painel B as setas brancas indicam a detecção da proteína Hsp70. Os três painéis menores abaixo mostram a co-localização em destaque.

Nessa mesma preparação também observamos que os corpúsculos de inclusão aparecem em tamanhos variados. À Figura 63 nota-se que as células onde a Hsp70 está com maior nível de expressão há uma tendência dos corpúsculos de inclusão apresentarem tamanho reduzido (setas brancas). Células onde a proteína Hsp70 não está com nível tão alto de expressão, os corpúsculos de inclusão estão com tamanho próximo aos das células em que a detecção de Hsp70 é baixa, supostamente expressão endógena (setas amarelas).

Considerando-se os resultados até aqui, há uma aparente incongruência entre a diminuição de tamanho dos corpúsculos de inclusão e o aumento da eficiência de expressão dos minigenomas frente a uma maior expressão de Hsp70. Uma hipótese a considerar é de que haveriam mais corpúsculos de inclusão menores onde estaria havendo transcrição do minigenoma, na condição de maior expressão de Hsp70. Assim, é preciso estarmos certos de que o aumento da expressão de Hsp70 está realmente relacionado a uma maior expressão dos minigenomas.

Figura 62- Co-localização e efeito da superexpressão de Hsp70 sobre os corpúsculos de inclusão.

Todas as células foram transfectadas com 1 μ g de minigenoma + 1 μ g de pcDNA3-Hsp70. Painel A – Detecção dos corpúsculos de inclusão com policlonal anti-N; Painel B – Detecção de Hsp70 com anticorpo monoclonal anti-Hsp70. Painel C- Sobreposição das imagens dos painéis A e B. Os três painéis menores abaixo mostram detalhe de outro campo com a co-localização em destaque, sendo o aumento (pelo programa de imagem) de aproximadamente 2x com relação aos painéis de cima (20X). Está apresentada imunofluorescência com anticorpos anti-N e anti-Hsp70, detectados com os conjugados anti-coelho Alexafluor-488 (verde) e anti-camundongo Alexafluor-594 (vermelho) (ver item 3.9.19).

Figura 63 - Efeito da superexpressão de Hsp70 sobre o tamanho dos corpúsculos de inclusão.

Todas as células foram transfectadas com 1 μ g de minigenoma + 1 μ g de pcDNA3-Hsp70. Estão indicados acima dos painéis os anticorpos detectados e a sobreposição das imagens. Em A aumento de 40x e em B aumento de 60x. Está apresentada imunofluorescência com anticorpos anti-N e anti-Hsp70, detectados com os conjugados anti-coelho Alexafluor-488 (verde) e anti-camundongo Alexafluor-594 (vermelho) (ver item 3.9.19). As setas brancas mostram células com a Hsp70 superexpressa (corpúsculos de inclusão com tamanho reduzido) e as setas amarelas mostram células com a Hsp70 expressa em menor nível (corpúsculos de inclusão com tamanho normal).

4.8.5 Cinética do efeito de superexpressão de Hsp70 na atividade do minigenoma

Para analisar com mais detalhe a relação entre o nível de expressão de Hsp70, células BSRT7/5 foram divididas em 3 grupos, todas transfectadas com 1 μ g de minigenoma, e cada grupo recebeu pcDNA3 ou pcDNA3-Hsp70 nas quantidades de 0,5 ou 1 μ g. Após 6 h, 16 h, 24 h e 36 h essas células foram coletadas, e com elas realizadas a quantificação da atividade da luciferase, normalizada por β -gal. À Figura 64 é possível ver um aumento da atividade dos minigenomas após 24 h e 36 h, inclusive para a transfecção com 0,5 μ g pcDNA3-Hsp70. Este

dado indica que há uma correlação entre aumento da expressão de Hsp70 e maior eficiência do complexo de replicação do HRSV.

Figura 64 – Cinética do efeito de superexpressão de Hsp70 na atividade do minigenoma.

O gráfico mostra os diferentes grupos de células após transfecção com minigenoma (eixo x) pela atividade da Luciferase/β-gal (eixo y). Todos os grupos foram transfectados com o conjunto de plasmídeos para observar atividade do minigenoma (ver item 3.9.17), total de 1 µg de DNA, e com: 1 µg pcDNA3; 0,5 µg pcDNA3 + 0,5 µg pcDNA3-Hsp70; ou 1 µg pcDNA3-Hsp70, conforme indicado. A atividade das enzimas foi medida após 6 h, 15 h, 24 h e 36 h.

4.9 Testes de imunização

As proteínas de HRSV abordadas neste estudo foram testadas anteriormente no laboratório como imunógenos tanto como proteínas recombinantes expressas em bactérias, como no formato de vacinas de DNA (Ribeiro, 2012; Simabuco et al, 2007; Simabuco, 2009; Simabuco et al, 2009; Tamura, 2009). A proteína M foi expressa em bactérias com vetor pET e em células de mamífero com pShuttle (Tamura, 2009), que foram testados em imunização de camundongos como proteína associada a adjuvante ou como vacina de DNA, respectivamente. Os resultados com M mostraram indução de resposta humoral para a

proteína (sem resposta celular) e resposta celular para DNA (sem resposta humoral), porém em ensaio de desafio em camundongos, não houve proteção (Ribeiro, 2012; Tamura, 2009).

Já para N e P houve um misto de respostas celular e humoral tanto para imunização com proteínas como para DNA (Simabuco, 2009, Simabuco et al., 2009). As proteínas N e P foram expressas em bactéria com o vetor pMAL (New England Biolabs), sistema em que a proteína é adicionada em fusão ao terminal carboxi da proteína de ligação à maltose (MBP) bacteriana. A vantagem desse sistema é que a proteína de fusão é solúvel e pode ser purificada em colunas de amilose, e em seguida obtida purificada pela digestão com uma protease e separação cromatográfica. No sistema utilizado o sítio de clivagem é para enteroquinase, que não se mostrou eficiente (Simabuco et al, 2007, Simabuco, 2009). Fizemos um trabalho de substituição desse sítio pelo da protease TEV, mas não conseguimos melhorar o processo (resultados não apresentados).

Nos resultados apresentados a seguir buscamos subsídios uma análise mais cuidadosa tanto das imunizações com DNA para N e P, quanto de se as proteínas de fusão MBP-N e MBP-P (não digeridas com protease) seriam eficientes como imunógenos. Além disso, para esses quatro imunógenos, foram feitos experimentos para verificar se ocorre proteção frente ao desafio com HRSV, em camundongos.

4.9.1 Imunização com DNA

Para a realização deste experimento foram obtidos camundongos BalbC (fêmeas com 8 a 10 semanas), divididos em três grupos de cinco animais, e imunizados com pShuttleNopt, pShuttlePopt ou pShuttle. Foram feitas quatro imunizações e quatro coletas de sangue (ver item 3.10.2) segundo o esquema à Figura 65.

Figura 65 - Esquema de imunização com DNA.

Uma semana após a última imunização os animais foram sacrificados e as células do baço colhidas para a realização do ELISPOT (ver item 3.10.4). As células dos animais vacinados foram estimuladas com as proteínas MBP, MBP-N ou MBP-P, e os resultados apresentados na Figura 66 indicam que na imunização com pShuttleNopt o estímulo com MBP foi inferior quando comparado ao estímulo com MBP-N. Resultado similar foi obtido para imunização com pShuttlePopt, sendo o estímulo com MBP inferior quando comparado ao estímulo com MBP-P. Já no controle de imunização com o vetor vazio (pShuttle) não houve diferença, mostrando que a imunização com pShuttleNopt e pShuttlePopt foram capazes de gerar resposta celular. Os resultados foram significativos, $p\text{ value} < 0,0001$.

Figura 66- Resposta celular em animais imunizados com DNA.

Após imunização com pShuttleNopt, pShuttlePopt ou pShuttle, o número de células secretoras de IFN-γ após estímulo com as proteínas MBP-N, MBP-P ou MBP (ensaio feito em triplicata) foi medido para cada animal (1 a 5, símbolos indicados no inserto), pela técnica de ELISPOT. Os pontos (média simples das triplicatas) de *immunospots* para cada animal estão apresentados, sendo que as barras indicam as médias de cada grupo. Para a análise estatística foi utilizado o teste Análise de Variância simples (One way ANOVA) no programa ©2013 GraphPad Software, Inc.

Com os soros obtidos nas quatro coletas indicadas à Figura 65 foi realizada a técnica de ELISA para avaliar a resposta imune humoral (ver item 3.10.3). Os soros dos três grupos imunizados com pShuttleNopt, pShuttlePopt ou pShuttle foram testados em placas sensibilizadas com as proteínas MBP-N, MBP-P ou MBP. Para os animais imunizados com pShuttleNopt foram feitas diluições dos soros 1:10, 1:100 e 1:300 (Figura 67 A, B e C, respectivamente), e testados frente as proteínas MBP-N e MBP. Os resultados mostram que nas coletas 2 e 3 foi possível detectar uma resposta imunológica humoral expressiva.

Figura 67 – Resposta humoral em animais imunizados com pShuttleNopt.

A

B

C

Estão apresentadas as absorbâncias obtidas em ensaios de ELISA contra as proteínas MBP-N e MBP, para os soros de cada animal (indicados por cores diferentes), obtidos nas quatro coletas. As diluições dos soros testadas foram de 1/10 (A), 1/100 (B) e 1/300 (C).

Para os animais imunizados com pShuttlePopt também foram feitas diluições dos soros 1:10, 1:100 e 1:300 (Figura 68 A, B e C, respectivamente), e testados frente as proteínas MBP-P e MBP. Os resultados mostram que apenas na diluição 1:10 dos soros foi possível detectar uma resposta humoral expressiva nas coletas 1, 2 e 3.

Figura 68 - Resposta humoral em animais imunizados com pShuttlePopt.

A

B **C**

Estão apresentadas as absorbâncias obtidas em ensaios de ELISA contra as proteínas MBP-P e MBP, para os soros de cada animal (indicados por cores diferentes), obtidos nas quatro coletas. As diluições dos soros testadas foram de 1/10 (A), 1/100 (B) e 1/300 (C).

Com os soros obtidos dos animais imunizados com pShuttle (controle com vetor vazio), foram feitos ensaios de ELISA frente às proteínas MBP-N, MBP-P e MBP, para avaliar a resposta humoral (Figura 69). Apenas na diluição 1:10 foi possível detectar um nível de absorbância mensurável, e o resultado indica dois pequenos aumentos na resposta humoral, para MBP (coleta 2) e MBP-N (coleta 3). Consideramos que esses aumentos não devem ser levados em conta, sendo apenas variações não expressivas.

Figura 69 - Resposta humoral em animais imunizados com pShuttle.

Estão apresentadas as absorbâncias obtidas em ensaios de ELISA contra as proteínas MBP-N, MBP-P e MBP, para os soros de cada animal (indicados por cores diferentes), obtidos nas quatro coletas. Os soros foram testados na diluição de 1/10.

4.9.2 Imunização seguida de desafio com HRSV

Para a realização do experimento de desafio com HRSV após imunizações tanto com DNA como com as proteínas de fusão, foram obtidos camundongos BalbC (fêmeas com 8 a 10 semanas). Os animais foram divididos em sete grupos com cinco animais cada, e imunizados com pShuttleNopt, pShuttlePopt, pShuttle, MBP, MBP-P ou MBP-N, além de um controle não imunizado ou infectado (ver itens 3.10.1 e 3.10.2). Foram feitas imunizações e coletas dos soros conforme o esquema à Figura 70, e infecção com HRSV como descrito nos itens 3.10.5 e 3.10.6. Após uma semana os animais foram sacrificados, os pulmões de cada animal retirados, sendo um utilizado para extração de RNA e o outro para obter cortes histológicos como descrito nos itens 3.10.7 e 3.10.8.

Figura 70 - Esquema do experimento de imunização seguido de desafio com HRSV.

Com os soros obtidos nas duas coletas de sangue (pré-coleta e coleta 1, Figura 70), foi medida a resposta humoral por ELISA. À Figura 71 estão apresentados os resultados das imunizações com as proteínas. Como esperado houve resposta humoral significativa contra todas. Foram feitos também testes de ELISA para os grupos imunizados com DNA, sendo observada resposta humoral similar à obtida no experimento apresentado nas Figuras 67, 68 e 69 (resultados não apresentados).

Figura 71 – Resposta humoral em animais imunizados com as proteínas de fusão.

Camundongos foram imunizados conforme o esquema à Figura 70, e os soros de cada animal (indicados por cores diferentes) obtidos na pré-coleta e coleta 1, testados por ELISA contra as proteínas MBP-N, MBP-P e MBP. Abaixo das barras está indicado o grupo imunizado pela proteína de sensibilização do ELISA e a coleta correspondente. A diluição do soro utilizada foi 1/10.

Como descrito anteriormente um dos pulmões dos animais imunizados foi submetido aos procedimentos para a realização dos cortes histológicos. Fizemos uma observação preliminar das lâminas nos aumentos de 40x e 100x (não apresentado), e as enviamos a um

serviço de patologia, marcadas por códigos (ver item 3.10.8). Foi analisada a ocorrência de pneumonia e infiltrados de linfócitos, macrófagos e eosinófilos. A Tabela 4 mostra a média geométrica dos sintomas apresentados nos cortes histológicos dos pulmões dos animais imunizados com DNA ou proteínas. O grupo imunizado com pShuttleNopt foi o grupo que apresentou um maior *score* em pneumonia em relação aos demais. Já os infiltrados celulares permaneceram iguais em todos os outros grupos.

Tabela 2 – Análise histopatológica.

	Pneumonia	Linfócito	Macrófagos	Eosinófilos
pShuttleNopt	1,6	0	1	1
pShuttlePopt	1	0	1	1
pShuttle	1	0	1	1
MBP-N	1	0	1	1
MBP-P	1	0	1	1
MBP	1	0	1	1

Estão apresentados os escores *Scores* dos efeitos histopatológicos observados nas lâminas dos cortes dos pulmões dos animais imunizados com DNA pShuttleNopt, pShuttlePopt, pShuttle, ou com as proteínas de fusão MBP-N, MBP-P e MBP.

O outro pulmão de cada animal foi utilizado para a quantificação da carga viral por *Real Time PCR*. À Figura 72 estão apresentados os resultados da quantificação do RNA viral nos grupos imunizados com as proteínas MBP-N, MBP-P ou MBP, ou com os DNAs pShuttleNopt, pShuttlePopt ou pShuttle. Esses resultados indicam que nos grupos imunizados com MBP-N ou pShuttleNopt, foi possível observar uma resposta de proteção contra o HRSV. Os resultados foram significativos, *p value* < 0,0001.

Figura 72 - Carga viral após imunização com DNA e proteínas de fusão seguida de desafio.

O gráfico mostra a quantificação do genoma de HRSV nos grupos imunizados com DNA (pShuttlePopt, pShuttleNopt ou pShuttle) e proteína de fusão (MBP-P, MBP-N e MBP). Cada ponto corresponde a um animal imunizado. Para a análise estatística foi utilizado o teste Análise de Variância simples (One way ANOVA) no programa ©2013 GraphPad Software, Inc.

Para confirmar os resultados anteriores repetimos o experimento de imunização seguido de desafio com HRSV. Foram utilizados camundongos BalbC (machos com 8 a 10 semanas). Os animais foram divididos em sete grupos com cinco animais cada, e imunizados com pShuttleNopt, pShuttlePopt, pShuttle, MBP, MBP-P ou MBP-N, além de um controle não imunizado ou infectado (ver itens 3.10.1 e 3.10.2). Foram feitas imunizações e coletas dos soros conforme o esquema à Figura 73, e infecção com HRSV como descrito nos itens 3.10.5 e 3.10.6. Após uma semana os animais foram sacrificados, os pulmões de cada animal retirados, sendo um utilizado para extração de RNA e o outro para obter cortes histológicos como descrito nos itens 3.10.7 e 3.10.8.

Figura 73 - Esquema do segundo experimento de imunização seguido de desafio com HRSV.

Com os soros obtidos nas duas coletas indicadas à Figura 73 foi realizada a técnica de ELISA para avaliar a resposta imune humoral. Os soros dos três grupos imunizados com pShuttleNopt, pShuttlePopt ou pShuttle foram testados na diluição de 1:100 em placas sensibilizadas com as proteínas MBP-N, MBP-P ou MBP. Os resultados apresentados à Figura 74 A mostram que na coleta 1 foi possível detectar uma resposta humoral significativa para pShuttleNopt. Já para o grupo pShuttlePopt houve uma pequena resposta na coleta 1 e para pShuttle não houve resposta considerável (Figuras 74B e C, respectivamente, observar que as escalas das D.O. são diferentes).

Figura 74 – Resposta humoral em animais imunizados com pShuttleNopt, pShuttlePopt e pShuttle.

A

B **C**

Estão apresentadas as absorbâncias obtidas em ensaios de ELISA contra as proteínas MBP-N ou MBP-P ou MBP, para os soros de cada animal (indicados por cores diferentes), obtidos nas duas coletas conforme o esquema à Figura 73. Abaixo das barras está indicado o grupo imunizado pela proteína de sensibilização do ELISA e a coleta correspondente. A diluição dos soros foi de 1:100. A- pShuttleNopt, B- pShuttlePopt e C- pShuttle.

Com os soros obtidos nas duas coletas indicadas à Figura 73 foi realizada a técnica de ELISA para avaliar a resposta imune humoral dos grupos imunizados com as proteínas. Os soros (diluição de 1:100) dos grupos imunizados com MBP-N e MBP-P foram testados em placas sensibilizadas com as proteínas MBP-N, MBP-P ou MBP. Os resultados mostram que na coleta 1 houve um pequeno aumento na resposta humoral para os grupos imunizados com MBP-N (Figura 75 A) e MBP-P (Figura 75 B) quando comparadas com os respectivos controles (poços sensibilizados com MBP-N ou MBP-P comparados aos sensibilizados com

MBP). Isso indica forte resposta contra MBP, e resposta apenas detectável contra N e P, reforçando a importância de obter as proteínas N e P individualizadas.

Figura 75 – Resposta humoral em animais imunizados com MBP-N e MBP-P.

A

B

Estão apresentadas as absorbâncias obtidas em ensaios de ELISA contra as proteínas MBP-N ou MBP-P ou MBP, para os soros de cada animal (indicados por cores diferentes), obtidos nas duas coletas conforme o esquema à Figura 73. A diluição dos soros foi de 1:100. A- MBP-N e B- MBP-P.

De um dos pulmões de cada animal foi extraído o RNA viral e quantificada a carga viral por *Real Time PCR*. À Figura 76 estão apresentados os resultados referentes à quantificação do RNA viral nos grupos imunizados com DNA (pShuttleNopt, pShuttlePopt e pShuttle) ou proteínas (MBP-N, MBP-P e MBP). Esses resultados indicam que o grupo imunizado com pShuttleNopt teve a carga viral diminuída em relação ao grupo pShuttlePopt e

este em relação ao controle (pShuttle). Com esses dados, novamente foi possível observar uma resposta de proteção contra o HRSV. Já para os animais imunizados com as proteínas de fusão MBP-N e MBP-P também foi possível verificar a redução da carga viral com em relação ao grupo controle. Os resultados foram significativos, $p\text{ value} < 0,0001$.

Figura 76 - Carga viral após imunização com DNA e proteínas de fusão seguida de desafio.

O gráfico mostra a quantificação do genoma de HRSV nos grupos imunizados com DNA (pShuttleNopt, pShuttlePopt ou pShuttle) e proteína de fusão (MBP-N, MBP-P e MBP). Cada ponto corresponde a um animal imunizado. Para a análise estatística foi utilizado o teste Análise de Variância simples (One way ANOVA) no programa ©2013 GraphPad Software, Inc.

5 DISCUSSÃO

Nesta tese abordamos o HRSV sob vários aspectos tendo sido feitas questões sobre a interação vírus-célula e imunização. Desenvolvemos nosso trabalho a partir de dados anteriores do laboratório como detalhado no item 1.9 da Introdução. Numa primeira fase esses dados foram consolidados tanto no aspecto da interação vírus-célula, dando origem a uma publicação (Oliveira et al., 2013), quanto na obtenção de dados de imunização no modelo de camundongos, conforme apresentado em Resultados.

Numa segunda fase, para aprofundar os dados de interação vírus-célula, fiz um estágio no exterior possibilitado pelo estabelecimento em meados de 2012 de uma proposta de colaboração entre nosso laboratório e o grupo do Dr. Jean-François Élieouët, coordenador da Unidade de Virologia e Imunologia Molecular, no Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) em Jouy-en-Josas, França. Essa colaboração foi concretizada com a obtenção de projeto conjunto em chamada CAPES-COFECUB, e uma visita de trabalho que o Dr. Ventura fez ao INRA no mês de agosto de 2012. Os interesses dos dois grupos são próximos e a colaboração está centrada em explorar as interações entre proteínas virais e celulares cujas evidências buscamos consolidar neste trabalho de doutorado. As possibilidades de aprofundamento são viáveis e variadas, como por exemplo, a determinação dos domínios interagentes abrindo a perspectiva do desenvolvimento racional de antivirais. Assim, um dos benefícios que tivemos com o estágio sanduíche, foi enriquecer esta tese com dados obtidos em metodologias dominadas pelo grupo francês (Castagné et al 2004; Galloux et al., 2012; Tawar et al., 2009; Tran et al., 2009).

5.1 Interações entre proteínas celulares e proteínas virais expressas por transfecção

Iniciamos nossos experimentos com a estratégia de expressar as proteínas virais N, P e M em fusão com o peptídeo Flag em células HEK293T. Isso foi feito pela transfecção dos plasmídeos pFLAG-N, pFLAG-P, pFLAG-M (item 4.1). Essas proteínas expressas individualmente foram então imunoprecipitadas através de anticorpos altamente eficientes contra o peptídeo Flag (Terpe, 2003). Se as proteínas celulares identificadas anteriormente por espectrometria de massas (Tabela 1) estivessem presentes, co-imunoprecipitadas em quantidade significativa, seria possível detectá-las com anticorpos específicos. Nos resultados apresentados às Figuras 14, 15, 16, 17 e 18, confirmamos que N interage com as proteínas celulares Hsp70, PRMT5 e WDR77; P interage com Hsp70; e M com Nucleofosmina e

Tropomiosina. Um dado adicional que não foi indicado na espectrometria de massas é que P interage com Tropomiosina (Figura 18). No apêndice do trabalho em anexo (Oliveira et al., 2013), os géis estão apresentados por completo.

Para confirmar esses dados fizemos uma contra prova de interação, fazendo a imunoprecipitação com os anticorpos anti-WDR77, anti-NPM, anti-HSP70 ou anti-TPM em extrato de proteínas de HEK-293T transfectadas com os mesmos plasmídeos. A detecção das proteínas virais em fusão com Flag, feita com o anticorpo anti-Flag, está apresentada às Figuras 19, 20, 21 e 22, confirmando todas as interações, menos a de PRMT5 com N (resultado não apresentado). Verificando as propriedades do anticorpo anti-PRMT5 adquirido (Santa Cruz Biotechnology, Inc., item 3.8), constatamos que não é indicado para imunoprecipitação, e não conseguimos encontrar outro fornecedor que garantisse tal propriedade. Como comentado na Introdução (item 1.10.9), as proteínas PRMT5-WDR77 formam o core do complexo metilossomo. Confirmamos que esses complexos formam-se nas condições de transfecção utilizadas para obter a expressão das proteínas virais, através da imunoprecipitação com anti-WDR77 e detecção de PRMT5 (item 4.3, Figura 30). Dessa forma, podemos inferir que N interage com o complexo metilossomo através dessas proteínas, provavelmente ligando a WDR77 a quem é atribuída função de interação com proteínas parceiras ou substratos, posicionando a PRMT5 para metilar um alvo (Antonyamy et al., 2012).

5.2 Interações entre proteínas celulares e proteínas virais no contexto da infecção

Com a confirmação das interações pelas duas estratégias acima, o passo seguinte foi verificar se durante a infecção viral, essas observações também são sustentadas. Nos experimentos descritos no item 4.2, utilizamos os anticorpos anti-WDR77, NPM, Hsp70 ou TM em imunoprecipitações em extratos de células infectadas ou não. Às Figuras 23, 24 e 25 vemos que com Hsp70 são co-imunoprecipitadas N e P, mas não M, esta servindo como controle de especificidade, pois pela sua atividade de chaperona a Hsp70 poderia estar interagindo de forma inespecífica com proteínas superexpressas (Mayer 2010). Aliás, esse argumento também vale para o experimento apresentado à Figura 19, onde as proteínas virais foram expressas por transfecção e a imunoprecipitação é com anti-Hsp70.

Às Figuras 26, 27, 28 e 29 apresentamos resultados que confirmam as interações no contexto da infecção viral entre as proteínas NPM e M, WDR77 e N, TPM e M, e TPM e P, respectivamente. No apêndice do trabalho em anexo (Oliveira et al., 2013), esses géis estão

apresentados por completo. Como comentado no item anterior, aqui também não pudemos analisar a interação entre N e PRMT5.

5.3 Significado das interações

5.3.1 Interação da Hsp70 com HRSV e outros vírus

Brasier et al. (2004) foram os primeiros a mostrar a relação entre HRSV e Hsp70. Esses autores demonstraram que uma resposta similar à observada no choque térmico é induzida em células infectadas por HRSV, aumentando o nível de expressão de Hsp70 e alterando sua localização intracelular. A interação entre Hsp70 e o complexo de replicação de HRSV foi mostrada por Brown et al. (2005). Estes autores demonstraram que a Hsp70 está localizada em corpúsculos de inclusão em células infectadas e co-imunoprecipita com o complexo de polimerização do HRSV. Embora os autores não tenham demonstrado qual proteína é responsável pela interação, sugeriram ser mediada pela proteína N. Em seus experimentos de imunoprecipitação da proteína N, a proteína P foi imunoprecipitada juntamente com as proteínas M2-1 e Hsp70, o que não exclui uma interação entre Hsp70 e a proteína P. Nos dados discutidos até aqui, neste estudo, nós fornecemos a evidência experimental de que as proteínas N e P interagem com Hsp70 (Figuras 14, 19, 23, 24). No entanto, a possibilidade de outras proteínas do complexo de replicação do HRSV interagirem com Hsp70 não pode ser descartada.

A proteína N expressa isoladamente interage de forma não específica com RNAs, formando estruturas semelhantes a nucleocapsídeos (Murphy et al., 2003) e essa interação não-específica com RNAs pode ser prevenida pela presença de proteínas P (Castagné et al., 2004). Foi postulado que a cinética de ligação rápida e fraca de proteínas N e P facilita o movimento do complexo da polimerase (proteínas de L e P) ao longo do nucleocapsídeo (RNA e N) para o vírus do Sarampo (Kingston et al., 2004). No entanto, mudanças conformacionais no complexo N-P são necessárias para o encapsidamento, permitindo que o molde de RNA seja posicionado no sítio ativo do polimerase (Cowton et al., 2006). A dissecação da interação das proteínas N e P com Hsp70 merece um estudo mais aprofundado a fim de esclarecer o seu potencial papel na replicação do HRSV, e é no que decidimos investir na segunda fase do trabalho como reportado nos resultados e discutido mais adiante. A localização de Hsp70 nos corpúsculos de inclusão (Brown et al., 2005 e dados relatados aqui) suporta a noção de que o recrutamento de Hsp70 para o encapsidamento do RNA viral

pode ajudar na ação de N-P para permitir a exposição do RNA viral à síntese de RNA pela proteína L. Em apoio a este modelo, Zhang et al. (2002) demonstraram que a transcrição e a replicação do vírus do Sarampo é estimulada pela Hsp72, que interage com um domínio regulatório da proteína N. Mais recentemente, Lahaye et al. (2012) mostraram que a Hsp70 tem um papel no controle da replicação do vírus da Raiva, outro vírus com genoma de RNA de polaridade negativa, assim como o HRSV e o vírus do Sarampo.

A interação de proteínas de choque térmico com outros complexos de replicação de vírus como HIV-1, HCV, HBV e hantavírus (Chen et al, 2010; Iordanskiy et al., 2004; Liu et al., 2009; Yu et al., 2009) também aponta nessa direção. Como há presença de regiões intrinsecamente desordenadas nas proteínas dos complexos de replicação viral, há a possibilidade de que as ligações entre essas proteínas e a Hsp70 não ocorram para facilitar a dobragem e nem proteger as proteínas virais de sua degradação, mas sim promover a ligação delas com suas proteínas parceiras para correta formação do vírion (Hegyí, Tompa, 2008).

Nesse sentido, podemos citar outros exemplos na literatura. Sabe-se que a Hsp70 aumenta a transcrição e replicação do vírus do papiloma humano através da montagem e pré-integração de complexos (Liu et al., 1998). Para o vírus Herpes simplex do tipo 1 ocorre interação entre a proteína iniciadora UL9 e a Hsp70 (Tanguy, Boehmer, 2002). Os dados na literatura também mostram que a proteína do choque térmico interage com a proteína do nucleocapsídeo de hantavírus em células Vero em situação infectante (Yu et al., 2009). Também já foi descrito que a proteína Hsp72 se associa ao complexo da replicase do vírus da hepatite C aumentando a replicação do RNA viral (Chen et al., 2010). Através de análises com géis bi-dimensionais foi mostrado que a proteína Hsp70 está envolvida na formação do vírus da hepatite B em células HepG2.2.15 (Liu et al., 2009). E estudos mostram também que essa proteína é recrutada pelo vírus HIV-1 na replicação em macrófagos (Iordanskiy et al., 2004). Além disso, já foi visto que o HIV utiliza a Hsp70 para a importação nuclear dos complexos de pré-integração, na ausência de VP1 (Agostini et al., 2000), e interage com a proteína de gag para manter a integridade das partículas (Gurer et al., 2002; Gurer et al., 2005). Finalmente, outro exemplo é o SV40 que usa tanto a Hsc70 como a Hsp70 para realizar o dobramento da proteína VP1 do núcleo e de sua montagem em pentâmeros no citoplasma (Li et al., 2009).

5.3.2 Interação entre a proteína celular NPM e a proteína viral M

A Nucleofosmina (NPM, B23) é uma fosfoproteína altamente conservada e abundantemente expressa em todas as células e tem papel importante em muitos processos celulares (Borer et al., 1989; Chang, Olson, 1990; Szebeni, Olson, 1999; Yu et al., 2006) como apontado no item 1.10.6 da Introdução. Essas características indicam que a proteína M do HRSV pode estar recrutando NPM (Figuras 15, 20 e 26) para auxiliar o seu processo de montagem, organizando a camada da matriz do vírion e a formação do envelope viral. Em apoio a essa ideia, recentemente foi demonstrado que M faz a ligação entre o envelope viral e o nucleocapsídeo, desempenhando um papel vital no brotamento e viabilidade virais (Mitra et al., 2012).

Estudos com outros vírus também apontam para participação de NPM em seus processos de replicação. A proteína NPM participa em todo processo da formação do vírion do vírus adeno-associado (AAV) em situação infectante em células Hela. Utilizando co-imunofluorescência e co-imunoprecipitação foi demonstrado que a proteína NPM se associa a proteína Rep e também participa de atividades de endonucleases específicas essenciais para a replicação do AAV (Bevington et al., 2007).

Além disso, o vírus da Hepatite C recruta a proteína nucleolar NPM durante sua replicação (Mai et al., 2006).

A NPM interage com o adenovírus no núcleo e acredita-se que ela poderia estar participando como uma chaperona na montagem correta das proteínas do capsídeo viral (Samad et al., 2007). Foi observado que redução da expressão da NPM inibe significativamente a replicação do DNA viral, além disso, sugere-se que a NPM é necessária para a manutenção da correta estrutura do DNA do adenovírus (Samad et al., 2012). Outros autores também observaram que a NPM-1 é redistribuída a partir do nucléolo ao nucleoplasma durante a infecção por adenovírus, e participa da montagem de partículas e maturação do vírion (Ugai et al., 2012). A NPM estimula a importação nuclear de proteínas do Vírus da Hepatite B e esta pode estar intimamente relacionada com o ciclo de vida desse vírus (Lee et al., 2009). E finalmente, da nossa busca na literatura apontamos que a proteína UL24 do vírus herpes simplex-1 é capaz de interagir e induzir a redistribuição da NPM (Lymeropoulos et al., 2011).

5.3.3 Interação entre as proteínas PRMT5-WDR77 e a proteína viral N

Na introdução (itens 1.10.7 a 9), fizemos uma revisão da importância das proteínas PRMT5 e WDR77 em diversos processos celulares. Neste estudo mostramos que PRMT-5 e WDR77 co-imunoprecipitam com a proteína N (Figuras 16 e 17), no entanto N co-imunoprecipita apenas com WDR77 (Figuras 21 e 27) e não PRMT-5 (não mostrado). Como comentado no item 5.1, PRMT-5 e WDR77 interagem em células HEK293T (Figura 30) assegurando que nelas também é formado o metilossomo, explicando-se a falha de PRMT5 co-imunoprecipitar N pelo fato do anticorpo anti PRMT5 não funcionar em experimentos de imunoprecipitação. Podemos assim afirmar que esses dados apontam para o recrutamento do metilossomo para o complexo de replicação do HRSV, e os alvos de metilação podem ser as proteínas N, P, M2-1 ou L, levando à modulação das suas atividades.

Um fato que chama a atenção nas Figuras 23 e 27, onde N é co-imunoprecipitada com Hsp70 ou com WDR77, no contexto da infecção viral, é sua detecção como uma dupla banda. Nesses géis, pela posição relativa ao marcador de peso molecular, a banda de baixo tem 43 Kd. Assim, estaríamos detectando uma forma maior de N, que pode ser consequência de uma modificação pós-traducional, talvez metilação por PRMT5 já que N tem 16 argininas na sequência. Uma posição em especial é importante, a 132, que quando mutada (R132A) afeta fortemente a ligação de N a P (Galloux et al., 2012), colocando N como candidata a substrato de PRMT5.

O recrutamento do metilossomo por N também poderia estar relacionado com o fato de que uma das funções atribuídas a PRMT5 e WDR77 é de estabilizar o mRNA celular (Lee, Bedford 2002; Yu et al., 2004, item 1.10.7), e no nosso caso os RNAs ou mRNAs virais. Em apoio a esse argumento, um estudo de predição com ferramentas de bioinformática aponta que 17 proteínas humanas estão envolvidas no processamento do mRNA e no metabolismo do vírus da dengue entre elas estão as proteínas WDR77 e PRMT5 (Doolittle, Gomez 2011).

5.3.4 Interação entre a proteína celular TM com as proteínas virais M e P

Outra proteína celular que verificamos interagir com M, e P com menor eficiência, foi a tropomiosina (TM). TM é importante para a organização dos microfilamentos do citoesqueleto, especialmente pela estabilização da F-Actina (Bernstein et al., 1982 Broschat, 1990; Hitchcock, et al., 1988). Em células não-musculares múltiplas isoformas de TM são

expressas e participam em vários eventos que envolvem a formação do citoesqueleto (Gunning et al., 2008; Wang, Coluccio, 2010), ver item 1.10.10.

A F-Actina desempenha um papel crucial na replicação, montagem e brotamento do HRSV (Burke et al., 1998; Jeffree et al., 2007; Kalleward et al., 2005), e seu rearranjo em células infectadas tem sido relacionado com PI3K e Rac GTPase (Jeffree et al., 2007), e p38 MAPK e Hsp27 (Singh et al., 2007). Na ausência de tropomiosina, a actina filamentosa (F-Actina) pode ser alvo da cofilina, sendo cortada e ramificada (Ono, Ono, 2002). Neste trabalho, pudemos demonstrar que as proteínas M e P interagem com TM por ensaios de co-imunoprecipitação (Figuras 18, 22, 28 e 29). Nossa hipótese é que a alteração dos microfilamentos celulares associada à replicação do HRSV é devida ao sequestro de tropomiosina por M e P, levando ao relaxamento ou re-orientação da organização do citoesqueleto para favorecer o brotamento do vírus.

Estudos com outros vírus também apontam para participação de TM e F-Actina em seus processos de replicação. Dados da literatura mostram que a distribuição da actina do citoesqueleto de células ECV 304 é modificada pela infecção com o vírus da Dengue (Wang et al., 2010). Evidências de que o vírus ectroméliea ECTV-PH, causador da doença *mousepox*, interage com a proteína celular α -tropomiosina, pela sua co-localização em corpúsculos de inclusão, e que essa proteína celular é fundamental para sua replicação (Butler-Cole et al., 2007).

5.4 Abordagens em bactérias e *in vitro* para estudo das interações

Os dados de interação discutidos até aqui abrem um leque de pontos a explorar, partindo principalmente para abordagens visando o detalhamento de como ocorrem essas interações entre proteínas virais e celulares. Para isso é necessário tê-las expressas eficientemente, possibilitando estratégias de purificação. Inicialmente trabalhamos com clones de todas as proteínas virais e celulares, incluindo a subclonagem dos genes celulares com otimização de códons para expressão em bactérias (ver item 4.4.1). Utilizamos os vetores bacterianos pET28a e pGEX-4T-3 (Figuras 31 e 32) para possibilitar a purificação por afinidade com níquel ou ligação a glutationa, respectivamente, com o detalhe importante de que um porta resistência a Canamicina e o outro a Ampicilina. Aproveitamos a “fase de clonagem”, no laboratório do Dr. Éleouët para fazer também as subclonagens num vetor para células de mamífero o pcDNA3 (Figura 33).

Todos os vetores bacterianos foram testados e funcionaram, revelando que as construções foram bem sucedidas (não apresentado). À Figura 34 (item 4.4.2) temos um exemplo desses resultados para os vetores pGex-NPM, pGex-TM, pGex-WDR77 e pGex-PRMT-5. A estratégia de verificar a interação em bactérias baseia-se na co-transformação com dois vetores com marcas de resistência diferentes e seleção com mistura dos dois antibióticos. Após indução os dois vetores, pET e pGex, presentes na bactéria produzem as proteínas contendo cauda His ou GST, respectivamente. Ao fazer a lise das bactérias, e o *pull down* com resinas de níquel ou glutathiona sefarose, as proteínas co-expressas serão purificadas juntas se houver interação.

Para alguns pares de proteínas foram feitos testes iniciais, e à Figura 35 temos um exemplo em que tanto His-P como His-M foram co-purificadas com GST-TM, indicando que a interação entre TM e P ou M, é observada também em extrato bacteriano. Como apontado no item 4.4.1 de Resultados, no entanto, o volume de trabalho para lidar com todas as interações ao mesmo tempo seria muito grande, e decidimos olhar com mais detalhe a interação entre Hsp70 e N ou P.

5.5 Detalhamento da interação entre Hsp70 e as proteínas N e P

5.5.1 Estudo das Interações por co-expressão em bactérias entre Hsp70 e N ou P

Para caracterizar a interação entre Hsp70 e N ou P foram feitos experimentos de co-expressão em bactéria seguidos de *pull down* descritos nos itens 4.5.1 e 4.5.2. Começando pela proteína N, pudemos confrontar as duas construções que fizemos para Hsp70, em pGex ou pET, com as diversas construções de N já existentes no laboratório do Dr. Éleouët (Galloux et al., 2012), tanto com a proteína N integral, quanto com vários mutantes. À Figura 36, podemos ver que as construções GST-Hsp70 ou GST-N quanto purificadas com *GS-Beads* são capazes de trazer junto as proteínas N ou Hsp70 (canaletas 3 e 8, respectivamente). Essa interação é mais eficiente entre GST-N e His-Hsp70, indicando que GST no amino terminal de Hsp70 está interferindo. Como o mutante de N que tem o carboxi terminal deletado (1-252), e outro com a deleção adicional do *N-arm* (31-252), a interação foi forte (canaletas 5 e 6). A deleção do amino terminal, no entanto (252-391) abole a interação (canaleta 7). Foi testado também um mutante com troca de um aminoácido na região amino terminal (R132A) que tem a interação com P abolida (Galloux et al., 2012), e que manteve a

interação com Hsp70 (canaleta 9), indicando que regiões diferentes na superfície de N interagem com P e Hsp70.

À Figura 37, temos um controle mostrando que GST e N não interagem. Nessa figura temos também o dado de que o mutante N^o, que não se liga a RNA, mantém sua capacidade de interagir com Hsp70 (canaleta 6), indicando que regiões diferentes na superfície de N interagem com RNA (região central, Tawar et al, 2009) e Hsp70 (amino terminal entre os aa 31 e 252, dados discutidos acima).

A interação entre Hsp70 e P foi analisada de forma similar, também confrontando as construções que fizemos para Hsp70, com as diversas construções de P já existentes no laboratório do Dr. Éleouët (item 4.5.2). À Figura 38 podemos ver que a interação entre Hsp70 e P é melhor entre GST-P e His-Hsp70 (canaleta 1), do que entre GST-Hsp70 e His-P (canaleta 7), mais uma vez indicando que GST ancorada ao amino terminal de Hsp70 atrapalha a interação, provavelmente devido ao seu maior volume comparado à cauda His. O conjunto de mutantes de P com diferentes regiões deletadas, construídos em pGex, permitiu analisar a interação com His-Hsp70, evitando essa interferência. Os dados mostram a interação se dá tanto pelo amino terminal (mutantes 1-163 e 1-126, canaletas 3 e 6), quanto pelo carboxi terminal (mutantes 127-241 e 127-205, canaletas 4 e 5). Com a construção contendo a região central de P (120-160, canaleta 9), no entanto, a interação é fraca. À Figura 39, temos um experimento controle indicando que GST e Hsp70 não interagem.

A Hsp70 pode ajudar a estabilizar ou alterar a conformação de proteínas, e a interação se dá tipicamente entre um domínio desordenado da proteína cliente com o domínio C-terminal da Hsp70 (Breese et al., 2006, item 1.10.5). Tendo isso em vista, os nossos resultados de interação entre a Hsp70 e P estão coerentes, uma vez que verificamos uma fraca interação entre a Hsp70 e o domínio central, não desordenado e uma forte ligação entre a Hsp70 e os domínios desordenados localizados no C-terminal e N-terminal da proteína P (Llorente et al., 2008; Simabuco et al 2011). No entanto, como a presença de GST no amino terminal de Hsp70 diminui a eficiência de interação tanto com P (Figura 38, canaleta 9), quanto com N (Figura 36, canaletas 2 e 3), são necessários mais dados para entender essas dinâmicas de interação.

5.5.2 Estudo das Interações *in vitro* entre Hsp70 e proteínas virais

No sentido de caracterizar melhor as interações com as proteínas do HRSV investimos em outra abordagem, testar essas interações *in vitro* com a Hsp70 purificada (item 4.6). A

purificação de Hsp70 foi feita a partir de GST-Hsp70 purificada inicialmente por *GS-beads*, seguindo-se clivagem com trombina e retirada da trombina. As amostras foram então incubadas com ATP, ADP ou mantidas apenas no tampão, seguindo-se gel-filtração (item 4.6.1). Os gráficos de medida de absorbância a 280nm obtidos no processo de eluição estão apresentados às Figuras 40, 42 e 44 (respectivamente, para as condições mencionadas). ATP aumenta e ADP diminui a afinidade de Hsp70 por peptídeos (Schmid et al., 1994), tendo sido essas condições utilizadas para tentar obter picos mais homogêneos, o que não ocorreu (Figuras 40 e 42). A melhor condição foi sem alterar o tampão de eluição (Figura 44). As frações de eluição obtidas foram analisadas em SDS-PAGE para cada uma dessas condições (Figuras 41, 43 e 45), e as frações com menor quantidade relativa de contaminantes selecionadas através do gel à Figura 45, foram utilizadas em experimentos de interação.

Como observado à Figura 36, o domínio amino terminal de N, ou N_{NTD} (Figura 6), é responsável por forte interação com Hsp70, e sendo um peptídeo com que o grupo do Dr. Éleouët trabalhou anteriormente foi selecionado para um experimento de interação *in vitro*, utilizando a técnica de RMN (item 4.6.2). Contamos com a colaboração de uma especialista, a Dra. Cristina Sizun do CNRS, que produziu o N_{NTD}, marcado isotopicamente e conduziu o experimento cujo resultado está apresentado à Figura 46. A interpretação foi de tendência à interação, porém devido à detecção de degradação não puderam ser tiradas conclusões seguras (ver item 4.6.2).

Aventou-se então a possibilidade de que para haver a estabilização desses complexos, e tirar dados conclusivos com a técnica de RMN, seria necessário o uso da co-chaperona Hsp40. A Hsp40 é importante como co-chaperona por ser capaz de estimular a atividade de ATPse da Hsp70 e fazer com que o *Lid* presente no SBD (*substrate binding domain*) se abra, e os peptídeos possam se ligar ao PBD (*peptide binding domain*), ver item 1.10.5. Com o plasmídeo pGex-Hsp40, cedido pela Dra. Sonia Longhi, obtivemos a expressão da proteína GST-Hsp40, porém houve um problema após a clivagem com trombina. O N-terminal da proteína Hsp40 também foi clivado e isso foi confirmado através da técnica de espectrometria de massas realizado e analisado pelo Dr. Didier Chevret no INRA (dados não apresentados). A Dra. Sonia Longhi nos cedeu gentilmente outro vetor com a Hsp40 ligada a cauda His, o pDEST (Couturier et al., 2009), porém não pudemos obter resultados a tempo de incluir nesta tese.

Como alternativa à técnica de RMN, já que tínhamos a Hsp70 purificada, utilizamos proteínas N, N_{NTD}, N^o, M2-1 ou M, expressas com cauda His e ligadas a *beads* de Níquel (item 4.6.3), para testar se eram capazes de se ligar a Hsp70 (*pull down*). Nos experimentos

apresentados às Figuras 47, 48, 49 e 50, observamos que a proteína Hsp70 purificada é capaz de interagir com aos peptídeos N, N^o e N_{NTD}, mas não (ou muito fracamente) com as proteínas M2-1 e M. Esses dados reforçam as observações discutidas até aqui e apontam a validade de um investimento maior em elucidar detalhes estruturais da interação de N_{NTD} com Hsp70.

5.5.3 Estudo da participação dos domínios da Hsp70 nas interações

Outra abordagem em que investimos, foi subclonar os domínios amino e carboxi terminal de Hsp70 e testá-los no protocolo de interações em bactérias. Como detalhado no item 4.7, esses domínios foram separados tendo o aminoácido 384 como fronteira, deixando PDB e *Lid* no domínio carboxi, e NDB no domínio amino terminal (Figura 8). O planejamento e a obtenção dessas construções no vetor pGex estão detalhados no item 4.7.1 (Figuras 51 e 52), bem como a verificação de que essas proteínas truncadas estão sendo bem expressas (Figura 53).

A pergunta que fizemos a seguir, foi com qual desses domínios o N_{NTD} interage, através do experimento de co-expressão descrito no item 4.7.2. O resultado apresentado à Figura 54 indica que ocorre interação de GST-Hsp70 N-terminal e GST-Hsp70 C-terminal com His-N_{NTD}, e que a interação de His- N_{NTD} com GST-Hsp70 N-terminal (canaleta 2) é mais intensa do que com GST-Hsp70 C-terminal (canaleta 3), contrariando as expectativas iniciais. Uma questão que precisa ser elucidada, no entanto, é se a baixa eficiência de interação entre N_{NTD} e o C-terminal da Hsp70, não está relacionada com o fechamento do PBD pelo *Lid* nas condições utilizadas.

5.6 Interferência de Hsp70 no Minigenoma e corpúsculos de inclusão

Além da caracterização das interações de Hsp70 até aqui discutidas, é necessário encontrar significado funcional para elas. Para tanto, lançamos mão de uma ferramenta importante no caso no HRSV, o minigenoma (Collins et al., 1995, ver item 3.9.17). Outro fenômeno que exploramos é a associação de Hsp70 a estruturas visíveis à microscopia, os corpúsculos de inclusão, formados pela co-expressão de N e P.

No item 4.8.1 estão apresentados dados do efeito de quercetina, um inibidor geral de proteínas de choque térmico (Elia, Santoro, 1994), sobre uma versão de minigenoma disponível no laboratório do Dr. Eléouët (Fix et al., 2011). Nos resultados apresentados à

Figura 55 observamos um aumento da atividade da Luciferase (replicação e expressão do minigenoma de HRSV) na presença do inibidor quando comparada ao grupo controle, especialmente a 43 °C. O efeito de quercetina sobre a expressão de Hsp70, no entanto, não foi de inibição significativa como esperávamos, nas células BSRT7/5 (Figura 56).

O efeito de quercetina sobre a formação de corpúsculos de inclusão também foi analisado por imunofluorescência para detecção de N, sendo feita também a detecção de Hsp70 para ver co-localização (item 4.8.2). Nesse experimento foi co-transfectado o vetor pcDNA3-Hsp70 para provocar superexpressão de Hsp70. Na Figura 57 painel A é possível ver os corpúsculos de inclusão pela combinação das proteínas N e P do HRSV (seta branca). No painel B é possível ver que na presença da quercetina, os corpúsculos de inclusão estão com o seu tamanho aumentado (setas brancas). Já no painel C observamos que na superexpressão de Hsp70 pela transfecção do plasmídeo pcDNA3-Hsp70 (seta amarela), e os corpúsculos de inclusão estão com tamanho reduzido (seta branca). Nota-se uma coerência do aumento do diâmetro dos corpúsculos de inclusão com o aumento da expressão de N na Figura 56, pelo efeito da quercetina. O efeito dessa droga, no entanto, não correspondeu às expectativas para tirarmos conclusões claras.

Decidimos então investir na modulação da Hsp70 pela superexpressão por transfecção, que se mostrou efetiva (Figura 57 C). No experimento descrito no item 4.8.3, buscou-se caracterizar o efeito dessa modulação sobre a atividade do minigenoma, pela transfecção de quantidades diferentes do plasmídeo pcDNA3-Hsp70. À Figura 58 o efeito de estímulo com o aumento da quantidade de vetor transfectado é claro. As células desse experimento também foram submetidas à imunofluorescência para detecção de N (corpúsculos de inclusão) e Hsp70, pois no conjunto de vetores do sistema de minigenoma estão presentes os que expressam N e P. À Figura 59, é detectada a superexpressão de Hsp70 como consequência da transfecção (painel B), acompanhada de um aparente aumento do número de corpúsculos de inclusão, coerente com o aumento da atividade do minigenoma (Figura 58).

A estratégia de modular a expressão de Hsp70 por transfecção mostrou-se eficiente, assim investimos em novo experimento para detalhar seu efeito. No item 4.8.4 está apresentado experimento de transfecção do sistema minigenoma em três condições, um controle e duas concentrações de pcDNA3-Hsp70 (Figura 60). O efeito de aumento do nível de replicação acompanhando a maior expressão de Hsp70 foi reproduzido.

Amostras de cada condição foram analisadas por *Western Blot* com anticorpos contra cinco proteínas diferentes (Figura 61). Hsp70 foi detectada no controle (endógena), e

aumentou de forma coerente para as transfecções com 0,5 e 1 µg de pcDNA3-Hsp70. Tubulina manteve-se constante (controle de normalização), e para as proteínas N, P e M2.1 houve uma sensível queda com 1µg de pcDNA3-Hsp70.

Foi feita imunofluorescência com a condição que recebeu 1µg de pcDNA3-Hsp70, e à Figura 62 podemos ver em detalhe a detecção de N (verde) evidenciando a formação de corpúsculos de inclusão, de Hsp70 (vermelho) mostrando um padrão granular similar em várias regiões das células aos corpúsculos, e na junção das fluorescências a co-localização (em amarelo) de Hsp70 nos corpúsculos de inclusão. Esse dado corrobora dado anterior da literatura utilizando metodologia similar de detecção, porém em células infectadas com HRSV, e não pela expressão de minigenoma (Brown et al., 2005b). Como havia campos com células expressando diferentes níveis de Hsp70 e/ou minigenoma, buscamos mais detalhes do efeito do aumento da expressão de Hsp70 sobre a morfologia dos corpúsculos de inclusão. À Figura 63 as setas brancas apontam células com maior nível de expressão de Hsp70, nas quais os corpúsculos estão menores, e as setas amarelas apontam células com menor nível de expressão de Hsp70, nas quais os corpúsculos estão maiores.

Como mencionado no item 4.84, a incongruência entre a diminuição de tamanho dos corpúsculos de inclusão e o aumento da eficiência de expressão dos minigenomas frente a uma maior expressão de Hsp70, pode ser conciliada assumindo-se que haveria mais corpúsculos de inclusão menores. Assim, a somatória de transcrição pelos minigenomas contidos nesses corpúsculos de inclusão menores, levaria a uma condição de expressão mais eficiente. Como nos experimentos com minigenoma apresentados, o tempo após a transfecção adotado foi sempre de 24 hs, nos perguntamos se haveria mudança na eficiência de expressão ao longo do tempo pós transfecção. À Figura 64 (item 4.8.5), é apresentado um experimento com a cinética do efeito da superexpressão de Hsp70 sobre o nível de atividade do minigenoma, onde constatamos que ocorre aumento significativo a partir de 24 hs, com incremento no tempo de 36hs, da eficiência de expressão do minigenoma.

Concluindo, o conjunto dos dados discutidos neste item indica fortemente que Hsp70 tem um papel relevante no controle de replicação do HRSV.

5.7 Experimentos de Imunização DNA e com proteínas

Contemplando o segundo objetivo geral deste projeto (item 2.2.1), discutimos a seguir os experimentos de imunização com N e P, administradas como proteínas purificadas ou como vacinas de DNA em camundongos Balb/c (ver item 4.9).

No item 4.9.1, está relatado um experimento de imunização com DNA. Foram utilizados os plasmídeos contendo os genes de N e P otimizados (pShuttleNopt, pShuttlePopt e o controle pShuttle), estando o esquema de imunização apresentado à Figura 65. No ensaio de ELISPOT, com esplenócitos colhidos uma semana após a última imunização, as células de animais imunizados com pShuttleNopt ou pShuttlePopt responderam de forma significativamente superior (estímulo com MBP-N ou MBP-P) aos controles (Figura 66), confirmando a indução de resposta celular por esses imunógenos.

Nesse experimento também foi feita uma análise detalhada da resposta humoral com ensaios de ELISA para os soros coletados (Figura 65). À Figura 67 estão apresentados os resultados para três diluições dos soros da imunização com pShuttleNopt, testados em placas sensibilizadas com as proteínas MBP-N ou MBP. Os resultados mostram que nas coletas 2 e 3 foi possível detectar uma resposta imunológica humoral expressiva. À Figura 68 está apresentado o resultado de resposta humoral para imunização com pShuttlePopt, em experimento similar (sensibilização com MBP-P ou MBP) em que se observa uma resposta humoral, porém menos expressiva do que para pShuttleNopt. As respostas humorais para essas imunizações por DNA contra N e P também confirmaram dados preliminares anteriormente obtidos no laboratório.

No item 4.9.2, estão apresentados resultados de dois experimentos em que foi feito desafio com o vírus, após imunização. Os animais foram divididos em sete grupos e imunizados com pShuttleNopt, pShuttlePopt, pShuttle, MBP, MBP-P ou MBP-N, além de um controle não imunizado ou infectado. Cinco dias depois do desafio (Figuras 70 e 73) os animais foram sacrificados e os pulmões coletados para a quantificação de RNA viral pelo método de RT-qPCR ou análise histopatológica. Nesses experimentos monitoramos apenas a resposta humoral, para ter certeza de que a imunização foi efetiva.

Tentamos agregar um procedimento de imunohistoquímica, feito com um anticorpo monoclonal anti-MBP (major basic protein) proteína presente nos eosinófilos (Larson et al. 1995), gentilmente cedido pelo Dr. James J. Lee (Mayo Clinic, EUA). Essa metodologia foi anteriormente utilizada para analisar infiltrados em resposta a HRSV (Shao et al., 2011), e potencialmente possibilitaria maior precisão na análise dos infiltrados de eosinófilos, por um padrão independente da histopatologia. Infelizmente devido a várias dificuldades no processo de confecção das lâminas e coloração, acabamos não conseguindo resultados significativos (não apresentado).

Para o primeiro experimento, o monitoramento da resposta humoral mostrou respostas efetivas tanto para imunização com proteínas (Figura 71) quanto com DNA (não

apresentado). A análise histopatológica mostrou pouca variação dos parâmetros avaliados (pneumonia e infiltrados de linfócitos, macrófagos e eosinófilos, Tabela 2). Já a análise da carga viral nos pulmões, após desafio, mostrou-se bastante informativa (Figura 72). Houve uma redução significativa no grupo imunizado com pShuttleNopt, e uma tendência à redução no grupo imunizado com MBP-N.

No segundo experimento, o monitoramento da resposta humoral também mostrou respostas efetivas tanto para imunização com DNA (Figura 74) quanto com proteínas (Figura 75). A análise histopatológica mais uma vez mostrou pouca variação dos parâmetros avaliados (não apresentado). Já a análise da carga viral nos pulmões, após desafio, neste experimento também mostrou-se bastante informativa apesar da maior dispersão dos dados (Figura 76). Mais uma vez constatamos uma redução significativa no grupo imunizado com pShuttleNopt, e uma tendência à redução no grupo imunizado com MBP-N.

Este resultado é importante, pois significa proteção contra a infecção viral, que se acompanhada por uma diminuição do infiltrado linfocitário e da inflamação (que necessita de melhor monitoramento), indicam o caminho para desenvolvimento uma estratégia vacinal eficiente e segura, como apontado na Introdução (item 1.7).

Outra questão fundamental para a vacinação do HRSV é a variabilidade dos isolados virais que circulam em todo o mundo. Uma vacina eficaz deve proteger contra todas elas, e para isso é importante procurar um alvo altamente conservado nesses isolados, sendo que uma forte candidata é a proteína N, a mais conservada no HRSV (Venter et al., 2003). Além dos dados deste trabalho, há vários outros reportados na literatura para imunização com a proteína N.

A vacinação de bezerros com uma vacina recombinante do vírus expressando a proteína N do BRSV (vírus respiratório sincicial de bovinos, similar ao HRSV) não induziu anticorpos neutralizantes, porém foi capaz de induzir a resposta celular e produção de INF-gama, e isso resultou na redução da replicação do vírus no trato respiratório superior e inferior (Taylor et al., 1997). A vacinação em regime de *prime-boost* com DNA e proteína para a N do também do BRSV conferiu proteção contra o vírus (Letellier et al., 2008).

As nanopartículas compostas de 10-11 unidades de proteínas N recombinantes (Tawar et al., 2009) foram utilizadas para vacinar camundongos via intranasal. Foi observada resposta celular através da ativação de células TCD4+ e TCD8+ que foram capazes de reduzir significativamente os títulos de HRSV em camundongos sem sinais de exacerbação da doença (Roux et al., 2009).

O mesmo foi testado em vitelos utilizando as nanopartículas com a proteína N do HRSV, uma vez que a similaridade é de 94 %, com a N do BRSV. Os dados apresentados nesse estudo mostraram que a vacinação com as nanopartículas da proteína N do HRSV foram capazes de proteger contra os sintomas das doenças respiratórias e a replicação do vírus após desafio BRSV, sem sinais de exacerbação da doença (Riffault et al., 2010).

O mecanismo de ação dessas partículas foi analisado e foi observado que as nanopartículas são engolfadas rapidamente pelos macrófagos e células dendríticas. A via intranasal juntamente com o adjuvante de mucosa LT (R192G), em Balb/c apresentou um leve infiltrado de linfócitos e neutrófilos no pulmão, porém foi observado o recrutamento de células TCD4+ e TCD8+ conferindo imunidade protetora contra a replicação viral (Roux et al., 2008). A imunização de camundongos neonatais via mucosa com a proteína N do HRSV gerou proteção viral eficiente, que resultou na redução de 95% da carga viral, 5 dias após o desafio viral com HRSV até idade adulta precoce. No entanto, essa vacinação induziu perda de peso e uma infiltração de neutrófilos e eosinófilos nos compartimentos bronco-alveolares poucos dias após o desafio viral (Remot et al., 2012).

Finalmente, é muito provável que uma cura efetiva de HRSV precise da indução de imunidade Th1, envolvendo a ativação de células T citotóxicas secretoras de IFN- γ . Em adultos, foi visto que os linfócitos de memória da maioria dos indivíduos estudados reconhecem a proteína N (Cherrie et al., 1992).

6 CONCLUSÕES

6.1 Interação das proteínas virais com as proteínas celulares.

- Foram identificadas proteínas celulares capazes de interagir com as proteínas de matriz (M), nucleoproteína (N) e fosfoproteína (P) do HRSV, tanto expressas individualmente por transfecção com vetores quanto no contexto da infecção viral em células HEK-293T, através das técnicas de co-imunoprecipitação e *Western Blotting*. Hsp70 interage com N e P, nucleofosmina interage com M, as proteínas do complexo do metilossomo (PRMT5 e WDR77) interagem com N; e a tropomiosina interage com M e P;
- Em estudo de co-expressão em bactérias seguido de *pull down*, foi confirmado que tropomiosina interage com P e M, e que Hsp70 interage com N e P;
- Em estudo de co-expressão em bactérias seguido de *pull down*, foi observado que a proteína Hsp70 interage com o domínio amino terminal de N (N_{NTD}) e com os mutantes N^o que não associa com RNA, e R132A que não associa com P;
- Em estudo de co-expressão em bactérias seguido de *pull down*, foi observado que a proteína Hsp70 interage com os domínios amino e carboxi terminal de P (regiões não estruturadas), porém não interage com o *core domain* da proteína P;
- Em estudo de interação *in vitro* com proteínas purificadas seguido de *pull down*, foi observado que a proteína a Hsp70 interage com N, N^o e N_{NTD};
- Em estudo de co-expressão em bactérias seguido de *pull down*, foi observado que os domínios amino e carboxi terminal da proteína Hsp70 interagem com N_{NTD};
- O aumento de expressão de Hsp70 por transfecção em células BSRT7 promoveu um aumento da atividade do complexo de replicação do HRSV medido pelo ensaio com minigenoma;

- O aumento de expressão de Hsp70 por transfecção em células BSRT7 promoveu uma diminuição no diâmetro dos corpúsculos de inclusão de HRSV gerados pelo ensaio com minigenoma;
- Observamos a co-localização de Hsp70 e dos corpúsculos de inclusão de HRSV gerados pelo ensaio com minigenoma em células BSRT7;

6.2 Ensaios de Imunização com as proteínas N e P

- Os plasmídeos pShuttleNopt e pShuttlePopt, administrados como vacinas de DNA, foram capazes de induzir resposta celular, medida pela produção de INF- γ com a técnica de ELISPOT, e resposta humoral medida por ensaios de ELISA;
- A imunização com pShuttleNopt seguida de desafio com o HRSV levou a uma proteção com redução da carga viral, comparada aos grupos controle;
- A imunização com a proteína de fusão MBP-N seguida de desafio com o HRSV levou a uma proteção parcial com redução da carga viral, comparada aos grupos controle;

REFERÊNCIAS¹

- Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):553–64.
- Agostini I, Popov S, Li J, Dubrovsky L, Hao T, Bukrinsky M. Heat-shock protein 70 can replace viral protein R of HIV-1 during nuclear import of the viral preintegration complex. *Exp Cell Res.* 2000;259:398–403.
- Anderson LJ, Hierholzer JC, Bingham PG, Stone YO. Microneutralization test for respiratory syncytial virus based on an enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 1985;Dec;22(6):1050-2.
- Antonyasamy S, Bonday Z, Campbell RM, Doyle B, Druzina Z, Gheyi T, Han B, Jungheim LN, Qian Y, Rauch C, Russell M, Sauder JM, Wasserman SR, Weichert K, Willard FS, Zhang A, Emtage S. Crystal structure of the human PRMT5:MEP50 complex. 2012 Oct 30;109(44):17960-5.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology.* New York: John Wiley & Sons; 1994.
- Beck J, Nassal M. Efficient Hsp90-independent in vitro activation by Hsc70 and Hsp40 of duck hepatitis B virus reverse transcriptase, an assumed Hsp90 client protein. *J Biol Chem.* 2003;278:36128–38.
- Bedford MT, Clarke SG. Protein arginine methylation in mammals: Who, what, and why. *Mol Cell.* 2009;33(1):1–13.
- Bernstein BW, Bamburg JR. Tropomyosin binding to F-actin protects the F-actin from disassembly by brain actindepolymerizing factor (ADF). *Cell Motil.* 1982;2:1-8.
- Bevington JM, Needham PG, Verrill KC, Collaco RF, Basrur V, Trempe JP. Adeno-associated virus interactions with B23/Nucleophosmin: Identification of sub-nucleolar virion regions. *Virology.* 2007 January 5;357(1):102–13.
- Bhella D, Ralph A, Murphy LB, Yeo RP. Significant differences in nucleocapsid morphology within the Paramyxoviridae. *J Gen Virol.* 2002;83:1831–39.
- BioTech Plasmid. 2005a. [cited from 2013 ago 5]. Disponível em: <http://www.biovisualtech.com/bvplasmid/pET28a.htm>.
- BioTech Plasmid. 2005b. [cited from 2013 ago 5]. Disponível em: <http://www.biovisualtech.com/bvplasmid/pGEX-4T-3.htm>

¹ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Bitko V, Barik S. Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiol.* 2001;1:34.

Blount RE, Morris JA, Savage RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1956; Jul;92(3):544-9.

Bocchini JA Jr , et al. From the American Academy of Pediatrics: policy statements – modified recommendations for use of palivizumab for prevention of respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics.* 2009;124(6),1694–701.

Boeckh M, Berrey MM, Bowden RA, Crawford SW, Balsley J, Corey L. Phase 1 evaluation of the respiratory syncytial virus-specific monoclonal antibody palivizumab in recipients of hematopoietic stem cell transplants. *J Infect Dis.* 2001;184(3);350–4.

Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ. *Protein methods.* 2nd ed. New York: Wiley-liss; 1996.

Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell.* 1989;56:379–390.

Brasier AR, Spratt H, Wu Z, Boldogh I, Zhang Y, Garofalo RP, Casola A, Pashmi J, Haag A, Luxon B, Kurosky A. Nuclear heat shock response and novel nuclear domain 10 reorganization in respiratory syncytial virus-infected a549 cells identified by high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *J Virol.* 2004; 78,11461-76.

Breese EH, Uversky VN, Georgiadis MM, Harrington MA. The disordered amino-terminus of SIMPL interacts with members of the 70-kDa heat-shock protein family. *DNA Cell Biol.* 2006;25:704–14.

Broschat KO. Tropomyosin prevents depolymerization of actin filaments from the pointed end. *J Biol Chem.* 1990; 265, 21323-29.

Brown JH, Zhou Z, Reshetnikova L, Robinson H, Yammani RD, Tobacman LS, Cohen C. Structure of the mid-region of tropomyosin: Bending and binding sites for actin. *PNAS.* 2005a;Dec 27;102(52):18878-83.

Brown G, Rixon HW, Steel J, McDonald TP, Pitt AR, Graham S, Sugrue RJ. Evidence for an association between heat shock protein 70 and the respiratory syncytial virus polymerase complex within lipid-raft membranes during virus infection. *Virology.* 2005b;338:69–80.

Buchholz UJ, Finke S, Conzelmann KK. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol.* 1999 Jan;73(1):251-9.

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, 137-148.

Butler-Cole C, Wagner MJ, Da Silva M, Brown GD, Burke RD, Upton C. An ectromelia virus profilin homolog interacts with cellular tropomyosin and viral A-type inclusion protein. *Virology Journal*. 2007;4:76.

Cane PA. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol*. 2001;11(2):103–16.

Carrromeu C, Simabuco FM, Tamura RE, Farinha Arcieri LE, Ventura AM. Intracellular localization of human respiratory syncytial virus L protein. *Arch Virol*. 2007;152(12):2259–63.

Castagné N, Barbier A, Bernard J, Rezaei H, Huet JC, Henry C, Da Costa B, Eléouët JF.. Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain. *J Gen. Virol.* 2004; 85:1643–53.

Chang JH, Olson MO. Structure of the gene for rat nucleolar protein B23. *J Biol Chem*. 1990; 265:18227–33.

Chanock R, Roizman B, Myers R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg*. 1957 Nov;66(3):281-90.

Chen YJ, Chen YH, Chow LP, Tsai YH, Chen PH, Huang CY F, Chen WT, Hwan LH. Heat Shock Protein 72 Is Associated with the Hepatitis C Virus Replicase Complex and Enhances Viral RNA Replication *The Journal of Biological Chemistry*. 2010 Sep;285(36):28183–90.

Cherrie AH, Anderson K, Wertz GW, Openshaw PJ. Human cytotoxic T cells stimulated by antigen on dendritic cells recognize the N, SH, F, M, 22K, and 1b proteins of respiratory syncytial virus. *J Virol*. 1992;66(4):2102-10

Collins PL, Hill MG, Camargo E, Grosfeld H, Chanock RM, Murphy BR. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Dec;92(25):11563-7.

Collins PL, Chanock RM, Murphy BR. Respiratory Syncytial Virus. In: *Fields Virology*. 4. edição. Lippincott – Raven Publishers. Philadelphia. 2001.

Collins PL, Graham BS. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J Virol*. 2008 Mar;82(5):2040-55.

Collins PL, Melero JA. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: Still crazy after all these years *Virus Research*. 2011;162:80–99.

Connors M, Collins PL, Firestone CY, Murphy BR. Respiratory syncytial virus (RSV) F, G, M2 (22K), and N proteins each induce resistance to RSV challenge, but resistance induced by M2 and N proteins is relatively short-lived. *J Virol*. 1991;65(3):1634–37.

Coronel EC, Murti KG, Takimoto T, Portner A. Human parainfluenza virus type 1 matrix and nucleoprotein genes transiently expressed in mammalian cells induce the release of virus-like particles containing nucleocapsid-like structures. *J Virol*. 1999 Aug;73(8):7035-8.

Coronel EC, Takimoto T, Murti KG, Varich N, Portner A. Nucleocapsid incorporation into parainfluenza virus is regulated by specific interaction with matrix protein. *J Virol*. 2001 Feb;75(3):1117-23.

Cowton VM, McGivern DR, Fearn R. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. *J Gen Virol*. 2006; Jul;87(Pt 7):1805-21

Couturier M, Buccellato M, Costanzo S, Bourhisa JM, Shub Y, Nicaise M, Desmadril M, Flaudropsa C, Longhia S, Oglesbee M. High affinity binding between Hsp70 and the C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein requires an Hsp40 co-chaperone. *J Mol Recognit*. 2010 May-Jun;23(3):301-15.

Crowe Jr JE, Firestone CY, Murphy BR. Passively acquired antibodies suppress humoral but not cell-mediated immunity in mice immunized with live attenuated respiratory syncytial virus vaccines. *J Immunol*. 2001;167(7):3910-18.

Curran J, Marq JB, Kolakofsky D. An N-terminal domain of the Sendai paramyxovirus P protein acts as a chaperone for the NP protein during the nascent chain assembly step of genome replication. *J Virol*. 1995;69:849-855.

Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):109-21.

DeVincenzo J, Lambkin-Williams R, Wilkinson T, Cehelsky J, Nochur S, Walsh E, Meyers R, Gollob J, Vaishnav A. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U. S. A*. 2010;107(19):8800-5.

Dewhurst-Maridor G, Simonet V, Bornand JE, Nicod LP, Pache JC. Development of a quantitative TaqMan RT-PCR for respiratory syncytial virus. *Journal of Virological Methods*. 2004;120:41-9.

DiNapoli JM, Murphy BR, Collins PL, Bukreyev A. Impairment of the CD8+ T cell response in lungs following infection with human respiratory syncytial virus is specific to the anatomical site rather than the virus, antigen, or route of infection. *Virol J*. 2008;5:105.

Doolittle JM, Gomez SM. Mapping Protein Interactions between Dengue Virus and Its Human and Insect Hosts. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Feb 15;5(2):e954

Durigon EL, Takahashi VNO, Soares PBM, Botosso VF. Vírus sincicial humano: revisão e levantamento dos dados brasileiros. São Paulo: Divisão Hospitalar dos Laboratórios ABBOTT; 1999.

Elia G, Santoro G. Regulation of heat shock protein synthesis by quercetin in human erythroleukaemia cells. *Biochem J*. 1994 May 15;300(Pt 1):201-9.

Falsey AR, Walsh EE. Relationship of serum antibody to risk of respiratory syncytial virus infection in elderly adults. *J Infect Dis.* 1998;77(2):463–6.

Falsey AR, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin Microbiol Rev.* 2000 Jul;13(3):371-84.

Feldman SA, Hendry RM, Beeler JA. Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. *J Virol.* 1999 Aug;73(8):6610-7.

Fix J, Galloux M, Blondot ML, Eléouët JF. The insertion of fluorescent proteins in a variable region of respiratory syncytial virus L polymerase results in fluorescent and functional enzymes but with reduced activities. *Open Virol J.* 2011;5:103-8.

Friesen WJ, Wyce A, Paushkin S, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins. *J Biol Chem.* 2002 Mar 8;277(10):8243-7.

Galloux M, Tarus B, Blazevic I, Fix J, Duquerroy S, Eléouët JF. Characterization of a Viral Phosphoprotein Binding Site on the Surface of the Respiratory Syncytial Nucleoprotein. *J Virol.* 2012; JVI.00058-12.

Gamer J, Multhaup G, Tomoyasu T, McCarty JS, Rudiger S, Schonfeld HJ, Schirra C, Bujard H, Bukau B. A cycle of binding and release of the DnaK, DnaJ and GrpE chaperones regulates activity of the Escherichia coli heat shock transcription factor sigma32. *EMBO J.* 1996;15:607–617.

Garcia-Barreno B, Delgado T, Melero JA. Identification of protein regions involved in the interaction of human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleoprotein: significance for nucleocapsid assembly and formation of cytoplasmic inclusions. *J Virol.* 1996; 70:801– 808.

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 co-express the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. *Virology.* 1993;195, 243-247.

Glasser SW, Witt TL, Senft AP, Baatz JE, Folger D, Maxfield MD, Akinbi HT, Newton DA, Prows DR, Korfhagen TR. Surfactant protein C-deficient mice are susceptible to respiratory syncytial virus infection. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2009;297(1):L64–L72.

Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child.* 1986;140(6):543–6.

Grimmler M, Bauer L, Nousiainen M, Korner R, Meister G, et al. Phosphorylation regulates the activity of the SMN complex during assembly of spliceosomal U snRNPs. *EMBO.* 2005;Rep 6:70–6.

Gunning P, O'Neill G, Hardeman E. Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. *Physiol Rev.* 2008;88:1–35.

Gurer C, Cimorelli A, Luban J. Specific incorporation of heat shock protein 70 family members into primate lentiviral virions. *J Virol.* 2002;76:4666–70.

Gurer C, Hoglund A, Hoglund S, Luban J. ATPgammaS disrupts human immunodeficiency virus type 1 virion core integrity. *J Virol.* 2005; 79: 5557–67.

Harcourt J, Alvarez R, Jones LP, Henderson C, Anderson LJ, Tripp RA. Respiratory syncytial virus G protein and G protein CX3C motif adversely affect CX3CR1+ T cell responses. *J Immunol.* 2006;176(3),1600–08.

Harlow E, Lane D. *Antibodies: a laboratory manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1988.

Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature.* 1996;381:571–579.

Hegyi H, Tompa P. Intrinsically disordered proteins display no preference for chaperone binding in vivo. *PLoS Comput. Biol.* 4. 2008: e1000017.

Herrera JE, Savkur R, Olson MO. The ribonuclease activity of nucleolar protein B23. *Nucleic Acids Res.* 1995;Oct 11;23(19):3974-9.

Hitchcock-DeGregori SE, Sampath P, Pollard TD. Tropomyosin inhibits the rate of actin polymerization by stabilizing actin filaments. *Biochemistry.* 1998; 27, 9182–85.

Hurwitz JL. Respiratory syncytial virus vaccine development. *Expert Rev Vaccines.* 2011 Oct;10(10):1415–33.

Iordanskiy S, Zhao Y, DiMarzio P, Agostini I, Dubrovsky L, Bukrinsky M. Heat-shock protein 70 exerts opposing effects on Vpr-dependent and Vpr-independent HIV-1 replication in macrophages. *Blood.* 2004 Sep15;104(6):1867-72.

Jeffree CE, Brown G, Aitken J, Su-Yin DY, Tan BH, Sugrue RJ. Ultrastructural analysis of the interaction between F-actin and respiratory syncytial virus during virus assembly. *Virology.* 2007; 369, 309-23.

Johnson Jr PR, Olmsted RA, Prince GA, Murphy BR, Alling DW, Walsh EE, Collins PL. Antigenic relatedness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: evaluation of the contributions of F and G glycoproteins to immunity. *J Virol.* 1987; 61(10),3163–66.

Kalleward NL, Bowen AL, Crowe JE Jr. Cooperativity of actin and microtubule elements during replication of respiratory syncytial virus. *Virology.* 2005; 331, 73-81.

Kansas University. 2013. <http://www2.kumc.edu/soalab/LabLinks/vectors/pcdna3.htm>

Karlin D, Longhi S, Canard B. Substitution of two residues in the measles virus nucleoprotein results in an impaired self-association. *Virology* 2002;302:420–432.

Karlin D, Ferron F, Canard B, Longhi S. Structural disorder and modular organization in Paramyxovirinae N and P. *J Gen Virol.* 2003; Dec;84(Pt 12):3239-52.

Khattar SK, Yunus AS, Collins PL, Samal SK. Deletion and substitution analysis defines regions and residues within the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus that affect transcription, RNA replication, and interaction with the nucleoprotein. *Virology.* 2001 Jul 5;285(2):253-69.

Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, Jensen K, Parrott RH. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol.* 1969;Apr; 89(4):422-34.

Kingston RL, Baase WA, Gay LS. Characterization of nucleocapsid binding by the measles virus and mumps virus phosphoproteins. *J Virol.* 2004;78:8630–40.

Kityk R, Kopp J, Sinning I, Mayer MP. Open Conformation of Hsp70 Chaperones Structure and Dynamics of the ATP-Bound. *Elsevier Inc Molecular Cell.* 2012;48,1–12, December 28.

Kondgen S, Kuhl H, N’Goran PK, Walsh PD, Schenk S, Ernst N, Biek R, Formenty P, Matz-Rensing K, Schweiger B, Junglen S, Ellerbrok H, Nitsche A, Briese T, Lipkin WI, Pauli G, Boesch C, Leendertz FH, Pandemic human viruses cause decline of endangered great apes. *Curr Biol.* 2008;Feb 26;18(4):260-4.

Kondo T, Yoshida T, Miura N, Nakanishi M. Temperature-sensitive phenotype of a mutant Sendai virus strain is caused by its insufficient accumulation of the M protein. *J Biol Chem.* 1993; Oct; 268(29):21924-30.

Krause C D, Yang Z-H, Kim Y. S., Lee J H, Cook J R, Pestka S. Protein arginine methyltransferases: Evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacology & Therapeutics.* 2007;113:50–87.

Kumagai Y, Takeuchi O, Kato H, Kumar H, Matsui K, Morii E, Aozasa K, Kawai T, Akira S. Alveolar macrophages are the primary interferon α producer in pulmonary infection with RNA viruses. *Immunity.* 2007;27 (2), 240–252.

Lahaye X, Vidy A, Fouquet B, Blondel D. Hsp70 Protein Positively Regulates Rabies Virus Infection. *J Virol.* 2012; 86, 4743-51.

Larson KA, Horton MA, Madden BJ, Gleich GJ, Lee NA, and Lee JJ. The Identification and Cloning of a Murine Major Basic Protein Gene Expressed in Eosinophils. *The Journal of Immunology.* 1995,155:3002-12.

Lee J, Bedford M T. PABP1 identified as an arginine methyltransferase substrate using high-density protein arrays. *EMBO.* 2002; Rep 3,268–273.

Lee, J. H., Cook, J. R., Yang, Z. H., Mirochnitchenko, O., Gunderson, S. I., Felix, A. M., et al. PRMT7, a new protein arginine methyl transferase that synthesizes symmetric dimethylarginine. *J Biol Chem.* 2005;280,3656–64.

Lee, F.E., Walsh, E.E., Falsey, A.R., Lumb, M.E., Okam, N.V., Liu, N., Divekar, A.A., Hall, C.B., Mosmann, T.R. Human infant respiratory syncytial virus (RSV)-specific type 1 and 2 cytokine responses ex vivo during primary RSV infection. *J Infect Dis.* 2007;195(12),1779–88.

Lee SJ, Shim HY, Hsieh A, Min JY, Jung Gh. Hepatite B virus core interacts with host cell nucleolar protein Nucleophosmin 1. *J Microbiol.* 2009; Dec;47(6):746-52.

Lemanske RF. Viral infections and asthma inception. *J Allergy Clin Immunol.* 2004.

Letellier C, Boxus M, Rosar L, Toussaint JF, Walravens K, Roels S. Vaccination of calves using the BRSV nucleocapsid protein in a DNA prime-protein boost strategy stimulates cell-mediated immunity and protects the lungs against BRSV replication and pathology. *Vaccine.* 2008; 26(37):4840–8.

Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(5),379–390.

Li PP, Itoh N, Watanabe M, Shi Y, Liu P, Yang HJ, Kasamatsu H. Association of simian virus 40 vp1 with 70-kilodalton heat shock proteins and viral tumor antigens. *J Virol.* 2009.83:37–46.

Licciardo P, et al. The FCP1 phosphatase interacts with RNA polymerase II and with MEP50 a component of the methylosome complex involved in the assembly of snRNP. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(3):999–1005.

Liu JS, Kuo SR, Makhov AM, Cyr DM, Griffith JD, Broker TR, Chow LT. Human Hsp70 and Hsp40 chaperone proteins facilitate human papillomavirus-11 E1 protein binding to the origin and stimulate cell-free DNA replication. *J Biol Chem.* 1998; 273:30704–712.

Liu K, Qian L, Wang J, Li W, Deng X, Chen X, Sun W, Wei H, Qian X, Jiang Y, He F. Two-dimensional blue native/SDS-PAGE analysis reveals heat shock protein chaperone machinery involved in hepatitis B virus production in HepG2.2.15 cells. 2009; Mar;8(3):495-505.

Llorente MT, García-Barreno B, Calero M, Camafeita E, López JA, Longhi S, Ferrón F, Varela PF, Melero JA. Structural analysis of the human respiratory syncytial virus phosphoprotein: characterization of an alpha-helical domain involved in oligomerization. *J Gen Virol.* 2006;Jan;87(Pt 1):159-69.

Llorente MT, Taylor IA, López-Viñas E, Gomez-Puertas P, Calder LJ, García-Barreno B, Melero JA. Structural properties of the human respiratory syncytial virus P protein: evidence for an elongated homotetrameric molecule that is the smallest orthologue within the family of paramyxovirus polymerase cofactors. *Proteins.* 2008;Aug 15;72(3):946-58.

Lymberopoulos MH, Bourget A, Ben Abdeljelil N, Pearson A. Involvement of the UL24 protein in herpes simplex virus 1-induced dispersal of B23 and in nuclear egress. *Virology*. 2011;Apr10;412(2):341-8.

Mai RT, Yeh TS, Kao CF, SK Sun, H-H Huang and Y-H Wu Lee. Hepatitis C virus core protein recruits nucleolar phosphoprotein B23 and coactivator p300 to relieve the repression effect of transcriptional factor YY1 on B23 gene expression. *Oncogene*. 2006; 25,448–462.

Mayer MP, Schröder H, Rüdiger S, Paal K, Laufen T, Bukau B. Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hsp70. *Nat Struct Biol*. 2000 Jul;7(7):586-93.

Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. Zentrum für Molekulare Biologie (ZMBH), Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld. Heidelberg, Germany. 2004; 282,69120.

Mayer MP. Gymnastics of molecular chaperones. *Mol Cell*. 2010;Aug 13;39(3):321-31.

Mazumder B, Barik S. Requirement of Casein Kinase II-Mediated Phosphorylation for the Transcriptional Activity of Human Respiratory Syncytial Viral Phosphoprotein P: Transdominant Negative Phenotype of Phosphorylation-Defective P Mutants. *Virology*. 1995; May 10;209(1):284

Meric C, Spehner D, Mazarin V. Respiratory syncytial virus nucleocapsid protein (N) expressed in insect cells forms nucleocapsid-like structures. *Virus Res*. 1994 Feb; 31(2):187-201.

Miyairi I, DeVincenzo JP. Human genetic factors and respiratory syncytial virus disease severity. *Clin Microbiol Rev*. 2008;Oct;21(4):686-703.

Mitra R, Baviskar P, Duncan-Decocq RR, Patel D, Oomens AG. The human respiratory syncytial virus matrix protein is required for maturation of viral filaments. *J Virol*. 2012; 86, 4432-43.

Molecular Expression™. 2004
(<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/gallery/cells/bhk/bhkcells.html>)

Mufson MA, Orvell C, Rafnar B, Norrby E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*. 1985; 66 (Pt 10), 2111–24.

Munir S, Hillyer P, Le Nouen C, Buchholz UJ, Rabin RL, Collins PL, Bukreyev A. Respiratory syncytial virus interferon antagonist NS1 protein suppresses and skews the human T lymphocyte response. *PLoS Pathog*. 2011; 7,1336.

Murphy BR, Olmsted RA, Collins PL, Chanock RM, Prince G A. Passive transfer of respiratory syncytial virus (RSV) antiserum suppresses the immune response to the RSV fusion (F) and large (G) glycoproteins expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Virol*. 1988; 62 (10), 3907–10.

Murphy LB, Loney C, Murray J, Bhella D, Ashton P, Yeo RP. Investigations into the amino-terminal domain of the respiratory syncytial virus nucleocapsid protein reveal elements important for nucleocapsid formation and interaction with the phosphoprotein. *Virology*. 2003 Mar 1;307(1):143-53

Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, O'Brien KL, Roca A, Wright PF, Bruce N, Chandran A, Theodoratou E, Sutanto A, Sedyaningsih ER, Ngama M, Munywoki PK, Kartasasmita C, Simoes EA, Rudan I, Weber MW, Campbell H. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2011; 375 (9725),1545–55.

Navarro J, Lopez-Otin C, Villanueva N. Location of phosphorylated residues in human respiratory syncytial virus phosphoprotein. *J Gen Virol*. 1991; 72(Pt 6):1455–59.

O'Keeffe B, Fong Y, Chen D, Zhou S, Zhou Q. Requirement for a kinase-specific chaperone pathway in the production of a Cdk9/cyclin T1 heterodimer responsible for P-TEFb-mediated tat stimulation of HIV-1 transcription. *J Biol Chem* 2000;275:279–287.

Okuwaki M, Matsumoto K, Tsujimoto M, Nagata K. Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett*. 2001;506:272–276.

Okuda M, Horn HF, Tarapore P. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell*. 2000;103:127–140.

Oliveira AP, Simabuco FM, Tamura RE, Guerrero MC, Ribeiro PG, Libermann TA, Zerbini LF, Ventura AM. Human respiratory syncytial virus N, P and M protein interactions in HEK-293T cells. *Virus Res*. 2013; Jul 23. pii: S0168-1702(13)00232-3.

Olson MR, Hartwig SM, Varga SM. The number of respiratory syncytial virus (RSV)-specific memory CD8 T cells in the lung is critical for their ability to inhibit RSV vaccine-enhanced pulmonary eosinophilia. *J Immunol*. 2008;181(11),7958–68.

Ono S, Ono K. Tropomyosin inhibits ADF/cofilin-dependent actin filament dynamics. *J. Cell Biol*. 2002; 156:1065–76.

Peng Y, Chen F, Melamed J, Chiriboga L, Wei J. Distinct nuclear and cytoplasmic functions of androgen receptor cofactor p44 and association with androgen-independent prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:5236–41.

Pribul PK, Harker J, Wang B, Wang H, Tregoning JS, Schwarze J, Openshaw PJ. Alveolar macrophages are a major determinant of early responses to viral lung infection but do not influence subsequent disease development. *J Virol*. 2008; 82 (9),4441-48.

Reed JL, Brewah YA, Delaney T, Welliver T, Burwell T, Benjamin E, Kuta E, Kozhich A, McKinney L, Suzich J, Kiener PA, Avendano L, Velozo L, Humbles A, Welliver S RC, Coyle AJ. Macrophage impairment underlies airway occlusion in primary respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis*. 2008;198(12),1783–93.

Rega Institute for Medical Research. 2013 [cited from 2013 aug 5]. <http://rega.kuleuven.be/#sthash.hNmWO8fP.dpuf>

Ren J, Wang Y, Liang Y, Zhang Y, Bao S, Xu Z. Methylation of ribosomal protein S10 by protein-arginine methyltransferase 5 regulates ribosome biogenesis. *J Biol Chem.* 2010;285(17):12695–705.

Ribeiro PGG, Caracterização Funcional e Antigênica da Proteína de Matriz do Vírus Respiratório Sincicial Humano. 2012.

Riffault S, Meyer G, Deplanche M, Dubuquoy C, Durand G, Soulestin M, Castagné N, Bernard J, Bernardet P, Dubosclard V, Bernex F, Petit-Camurdan A, Deville S, Schwartz-Cornil I, Eléouët JF. A new subunit vaccine based on nucleoprotein nanoparticles confers partial clinical and virological protection in calves against bovine respiratory syncytial virus. *Elsevier Vaccine* 2010;28:3722–34.

Roberts SR, Compans RW, Wertz GW. Respiratory syncytial virus matures at the apical surfaces of polarized epithelial cells. *J Virol.* 1995; Apr;69(4):2667-73.

Roux X, Dubuquoy C, Durand G, Tran-Tolla TL, Castagne N, Bernard J, et al. Subnucleocapsid nanoparticles: a nasal vaccine against respiratory syncytial virus. *PLoS One* 2008;3(3):e1766.

Ruigrok RW, Crepin T, Kolakofsky D. Nucleoproteins and nucleocapsids of negative-strand RNA viruses. *Curr Opin Microbiol.* 2011;14:504–510.

Samad MA, Okuwaki M, Haruki H, Nagata K. Physical and functional interaction between a nucleolar protein nucleophosmin/B23 and adenovirus basic core proteins. 2007; Jul 10;581(17):3283-8

Samad MA, Komatsu T, Okuwaki M, Nagata K. B23/nucleophosmin is involved in regulation of adenovirus chromatin structure at late infection stages, but not in virus replication and transcription. *Journal of General Virology.* 2012;93,1328–38.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniats T. *Molecular Cloning: a laboratory manual.* 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Sanchez-Seco MP, Navarro J, Martinez R, Villanueva N. C-Terminal phosphorylation of human respiratory syncytial virus P protein occurs mainly at serine residue 232. *Journal of General Virology.* 1995;76,425-430.

Savkur RS, Olson MO. Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res.* 1998;26:4508–15.

Schlender J, Walliser G, Fricke J, Conzelmann KK. Respiratory syncytial virus fusion protein mediates inhibition of mitogen-induced T-cell proliferation by contact. *J Virol.* 2002;76(3), 1163–70.

Schmid D, Baici A, Gehring H, Christen P. Kinetics of molecular chaperone action. *Science.* 1994; Feb 18;263(5149):971-3.

Shao H-Y, Lin Y-W, Yu S-L, Lin H-Y, Chitra E. Immunoprotectivity of HLA-A2 CTL Peptides Derived from Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein in HLA-A2 Transgenic Mouse. *PLoS ONE*. 2011;6(9):e25500.

Shojania S, O'Neil JD. HIV-1 Tat is a natively unfolded protein: the solution conformation and dynamics of reduced HIV-1 Tat-(1–72) by NMR spectroscopy. *J Biol Chem*. 2006;281: 8347–56.

Sidwell RW, Barnard DL. Respiratory syncytial virus infections: recent prospects for control. *Antiviral Res*. 2006;Sep;71(2-3):379-90.

Simabuco FM, Carromeu C, Farinha-Arcieri LE, Tamura RE, Ventura AM. Production of polyclonal antibodies against the human respiratory syncytial virus nucleoprotein and phosphoprotein expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2007;May53(1):209-15.

Simabuco FM, Tamura RE, Carromeu C, Farinha Arcieri LE, Ventura AM. Gene optimization leads to robust expression of human respiratory syncytial virus nucleoprotein and phosphoprotein in human cells and induction of humoral immunity in mice. *J Virol. Methods*. 2009;158: 93–99.

Simabuco FM. Tese: Expressão das proteínas N e P do vírus respiratório sincicial humano: Estudos funcionais e de imunização. 2009.

Simabuco FM, Asara JM, Guerrero MC, Libermann TA, Zerbini LF, Ventura AM. Structural analysis of human respiratory syncytial virus P protein: Identification of intrinsically disordered domains. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011;42: 340-5

Singh D, McCann KL, Imani F. MAPK and heat shock protein 27 activation are associated with respiratory syncytial virus induction of human bronchial epithelial monolayer disruption. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 293, 436-45.

Smyth RL, Mobbs KJ, O'Hea U, Ashby D, Hart C A. Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis: Disease Severity, Interleukin-8, and Virus Genotype *Pediatric Pulmonology*. 2002; 33:339–346.

Spehner D, Drillien R, Howley PM. The assembly of the measles virus nucleoprotein into nucleocapsid-like particles is modulated by the phosphoprotein. *Virology*. 1997;Jun 9;232(2):260-8.

Stec DS, Hill MG, Collins PL. Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. *Virology*. 1991;183:273-287.

Stevens WW, Sun J, Castillo JP, Braciale TJ. Pulmonary eosinophilia is attenuated by early responding CD8(+) memory T cells in a murine model of RSV vaccine-enhanced disease. *Viral Immunol*. 2009;22(4),243–251.

Stott EJ, Taylor G, Ball LA, Anderson K, Young KK, King AM, Wertz GW. Immune and histopathological responses in animals vaccinated with recombinant vaccinia viruses that express individual genes of human respiratory syncytial virus. *J. Virol*. 1987;61(12),3855–61.

SynagisTM; MedImmune [cited from 2013 ago 5] - <http://www.medimmune.com/>

Suh WC, Burkholder WF, Lu CZ, Zhao X, Gottesman ME, Gross CA. Interaction of the Hsp70 molecular chaperone, DnaK, with its cochaperone DnaJ. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998; 95:15223–28.

Szebeni A, Olson MO. Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci* 1999;8:905–12.

Tabarani CM, Bonville CA, Suryadevara M, Branigan P, Wang D, Huang D, Rosenberg HF, Domachowske JB. Novel Inflammatory Markers, Clinical Risk Factors, and Virus Type Associated with Severe Respiratory Syncytial Virus Infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;Jun 25.

Tamura RE. Tese: Estudo dos domínios Funcionais da proteína de matriz do Virus Respiratório Sincicial Humano. 2009.

Tanguy Le Gac N, Boehmer PE. Activation of the herpes simplex virus type-1 origin-binding protein (UL9) by heat shock proteins. *J Biol Chem.* 2002; 277:5660–66.

Tawar RG, Duquerroy S, Vonnheim C, Varela PF, Damier-Piolle L, Castagné N, MacLellan K, Bedouelle H, Bricogne G, Bhella D, Eléouët JF, Rey FA. Crystal Structure of a Nucleocapsid-Like Nucleoprotein-RNA Complex of Respiratory Syncytial Virus. *Science.* 2009;Nov 27;326(5957):1279-83.

Taylor G, Thomas LH, Furze JM, Cook RS, Wyld SG, Lerch R. Recombinant vaccinia viruses expressing the F, G or N, but not the M2, protein of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) induce resistance to BRSV challenge in the calf and protect against the development of pneumonic lesions. *J Gen Virol* 1997;78(Pt 12):3195–206.

Tee WW, et al. Prmt5 is essential for early mouse development and acts in the cytoplasm to maintain ES cell pluripotency. *Genes Dev.* 2010; 24(24):2772–77.

Ternette N, Stefanou D, Kuate S, Uberla K, Grunwald T. Expression of RNA virus proteins by RNA polymerase II dependent expression plasmids is hindered at multiple steps. *Virol J.* 2007; Jun 5; 4:51.

Ternette N, Tippler B, Uberla K, Grunwald T. Immunogenicity and efficacy of codon optimized DNA vaccines encoding the F-protein of respiratory syncytial virus. *Vaccine.* 2007; Oct 10;25(41):7271-9.

Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003; Jan; 60(5):523-33.

Thorburn K, Harigopal S, Reddy V, Taylor N, van Saene HK. High incidence of pulmonary bacterial co-infection in children with severe respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. *Thorax.* 2006; Jul;61(7):611-5.

Tran TL, Castagne N, Dubosclard V, Noinville S, Koch E, Moudjou M, Henry C, Bernard J, Yeo RP, Eleouet JF. The respiratory syncytial virus M2-1 protein forms tetramers and interacts with RNA and P in a competitive manner. *J Virol*. 2009;83:6363-74.

Tran TL, Castagné N, Bhella D, Varela PF, Bernard J, Chilmonczyk S, Berkenkamp S, Benhamo V, Grznarova K, Grosclaude J, Nespoulos C, Rey FA, Eléouët JF. The nine C-terminal amino acids of the respiratory syncytial virus protein P are necessary and sufficient for binding to ribonucleoprotein complexes in which six ribonucleotides are contacted per N protein protomer. *J Gen Virol*. 2007;88:196–206.

Ugai H, Dobbins GC, Wang M, Le LP, Matthews DA, Curiel DT. Adenoviral protein V promotes a process of viral assembly through nucleophosmin 1. *Virology*. 2012;Oct 25;432(2):283-95.

Ulmer JB, DeWitt CM, Chastain M, Friedman A, Donnelly JJ, McClements WL, Caulfield MJ, Bohannon KE, Volkin DB, Evans RK. Enhancement of DNA vaccine potency using conventional aluminum adjuvants. *Vaccine*. 1999;Aug 20;18(1-2):18-28.

Uversky VN. Intrinsically disordered proteins from A to Z. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2011; 43:1090 –103.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001; 291:1304–51.

Venter M, Rock M, Puren AJ, Tiemessen CT, Crowe Jr JE. Respiratory syncytial virus nucleoprotein-specific cytotoxic T-cell epitopes in a South African population of diverse HLA types are conserved in circulating field strains. *J Virol*. 2003;77(13):7319–29.

Wang ACL, Coluccio L M. New Insights into the Regulation of the Actin Cytoskeleton by Tropomyosin *Int Rev Cell Mol Biol*. 2010;281:91–128.

Wolf SS. The protein arginine methyltransferase family: An update about function, new perspectives and the physiological role in humans. *Cell Mol Life Sci* 66. 2009;(13):2109–21.

Yu Y, Maggi LB Jr, Brady SN. Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export. *Mol Cell Biol*. 2006;26:3798–809.

Yu M C, Bachand F, McBride A E, Komili S, Casolari J M, Silver PA. Arginine methyltransferase affects interactions and recruitment of mRNA processing and export factors. *Genes Dev*. 2004;18:2024–35.

Yu L, Ye L, Zhao R, Liu Y F, Yang S J. HSP70 induced by Hantavirus infection interacts with viral nucleocapsid protein and its overexpression suppresses virus infection in Vero E6 cells *Am J Transl Res*. 2009;1(4):367-80.

Zhang W, Yang H, Kong X, Mohapatra S, San Juan-Vergara H, Hellermann G, Behera S, Singam R, Lockey RF, Mohapatra SS. Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. *Nat Med*. 2005;11(1):56–62.

Zhang X, Glendening C, Linke H, Parks CL, Brooks C, Udem SA, Oglesbee M. Identification and characterization of a regulatory domain on the carboxyl terminus of the measles virus nucleocapsid protein. *J Virol*. 2002;76:8737–46.

Zhang X, Bourhis JM, Longhi S, Carsillo T, Buccellato M, Morin B, Canard B, Oglesbee M. Hsp72 recognizes a P binding motif in the measles virus N protein C-terminus. *Virology*. 2005;337:162–74.

Zlateva KT, Lemey P, Moes E, Vandamme AM, Van Ranst M. Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein. *J Virol*. 2005;79(14):9157–67.

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Virus Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/virusres

Short communication

Human respiratory syncytial virus N, P and M protein interactions in HEK-293T cells

Andressa P. Oliveira^{a,1}, Fernando M. Simabuco^{a,b,1}, Rodrigo E. Tamura^{a,c,1},
Manuel C. Guerrero^d, Paulo G.G. Ribeiro^a, Towia A. Libermann^d,
Luiz F. Zerbini^{d,e}, Armando M. Ventura^{a,*}

^a Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade de Campinas, São Paulo, Brazil

^c Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO), Instituto do Câncer do Estado de São Paulo Octavio Frias de Oliveira (ICESP), São Paulo, Brazil

^d BIDMC Genomics Center, Harvard Medical School, Boston, MA, United States

^e International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) and Division of Medical Biochemistry, University of Cape Town, Cape Town, South Africa

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 March 2013

Received in revised form 6 July 2013

Accepted 11 July 2013

Available online xxx

Keywords:

Human respiratory syncytial virus

Nucleoprotein

Phosphoprotein

Matrix

Protein interaction

Optimized genes

ABSTRACT

Characterization of Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) protein interactions with host cell components is crucial to devise antiviral strategies. Viral nucleoprotein, phosphoprotein and matrix protein genes were optimized for human codon usage and cloned into expression vectors. HEK-293T cells were transfected with these vectors, viral proteins were immunoprecipitated, and co-immunoprecipitated cellular proteins were identified through mass spectrometry. Cell proteins identified with higher confidence scores were probed in the immunoprecipitation using specific antibodies. The results indicate that nucleoprotein interacts with arginine methyl-transferase, methylosome protein and Hsp70. Phosphoprotein interacts with Hsp70 and tropomyosin, and matrix with tropomyosin and nucleophosmin. Additionally, we performed immunoprecipitation of these cellular proteins in cells infected with HRSV, followed by detection of co-immunoprecipitated viral proteins. The results indicate that these interactions also occur in the context of viral infection, and their potential contribution for a HRSV replication model is discussed.

© 2013 Published by Elsevier B.V.

Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) is a negative-sense single-stranded RNA virus that belongs to the Paramyxoviridae family and the Pneumovirinae subfamily (Collins et al., 2001). HRSV is considered the most important pathogen causing respiratory disease in infants and neonates worldwide, which may present clinical complications like pneumonia and bronchiolitis (Holberg et al., 1991). This virus is responsible for a significant amount of the lower respiratory tract infections in infants up to one year of age and it is estimated that half of these infants have re-infections after one year (Schmidt et al., 2004). HRSV is also a significant cause of respiratory disease in the elderly (Han et al., 1999), immune-compromised patients, such as bone marrow transplant patients (Hall et al., 1986), and is related to the development of asthma in childhood (Lemanske, 2004). Since its discovery in the 1960s,

efforts have been made toward the development of a vaccine, but to date this has proved unsuccessful (Kim et al., 1969; Collins and Melero, 2011).

HRSV is enveloped and carries a negative-sense RNA genome of about 15 Kb that encodes 11 proteins. The nucleoprotein (N) associates with the viral RNA, and phosphoprotein (P) interacts with N and with the RNA-dependent RNA polymerase (L) to form the nucleocapsid. The genome also encodes three envelope proteins (F, G, SH), a matrix protein (M), a nucleocapsid-associated transcription factor (M2-1), another protein involved in genome replication (M2-2, the second product of the M2 gene) and two nonstructural proteins (NS1, NS2) (Collins et al., 2001).

In this work we searched cellular partners for the viral proteins N, P and M. N protein is highly conserved among pneumoviruses and interacts with viral RNA, generating a helicoidal nucleocapsid (Maclellan et al., 2007) which is responsible for genome and anti-genome resistance to RNase (Collins et al., 2001). P protein interacts with N protein, giving specificity for viral RNA encapsidation (Spehner et al., 1997) and interacts with L protein (the major unit of the virus replication complex), conferring stability and the correct placement in the ribonucleo-complex for RNA synthesis

* Corresponding author at: Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes, 1374, São Paulo, SP 05508-900, Brazil. Tel.: +55 11 3091 7276; fax: +55 11 3091 7354.

E-mail addresses: amventura@usp.br, amventura@gmail.com (A.M. Ventura).

¹ These authors contributed equally to this work.

(Bowman et al., 1999). M protein is involved in viral assembly and budding. During viral infection M is present in cytoplasmic inclusion bodies and is associated with ribonucleo-particles containing N, P, L and M2-1 proteins (Ghildyal et al., 2002, Carromeu et al., 2007). The association of M protein with the viral nucleocapsid is mediated by M2-1 protein (Li et al., 2008). There is also evidence that like the M protein of other negative-stranded RNA viruses, HRSV M protein may function as a virus transcription inhibition factor (Ghildyal et al., 2002, 2003).

These viral proteins most likely interact with host cell components and their identification is essential for understanding virus replication and devising antiviral strategies. We have cloned N, P (Simabuco et al., 2009) and M (reported in this work) genes, with optimized codons for expression in human cells. Here we report the tagging of M, N and P proteins with FLAG peptide; allowing co-immunoprecipitation experiments for partners' detection and identification by mass spectrometry (see the experimental design in Fig. 1A). The cellular partners were confirmed by immunoblotting in non-infected cells expressing viral Flag-tagged proteins or in HRSV infected cells expressing the wild type viral proteins. We observed that Heat-shock protein 70 (Hsp70), Arginine methyltransferase (PRMT5), Methylosome protein (WDR77), Tropomyosin (Tm) and Nucleophosmin (Npm) proteins interact with N, P and M, indicating their potential cooperation with the HRSV replication complex, and this will be discussed in more detail later.

The HRSV (strain A2) M, N and P genes were codon optimized for human cell expression and synthesized by GeneArt (see nucleotide sequences in Fig. 1). The genes were delivered in the pCR4-zero plasmid which allows subcloning in pFlag vector. The plasmids were digested with specific restriction endonucleases, BamHI-PmeI for M, and BamHI-EcoRI for N and P, and cloned into pFlag vector previously digested with the same enzymes. The pFlag vector is based on the pcDNA3 (Invitrogen) and contains the FLAG peptide coding sequence upstream from the multiple cloning site (Zerbini L.F., unpublished data).

The plasmids obtained, named pFlagMopt, pFlagNopt and pFlagPopt, were transfected in HEK293T cells and in all experiments pFlag (empty vector) was used as a control. Briefly, DNA was mixed with Lipofectamine PLUS Reagent (Invitrogen) in a serum free media and incubated for 15 min. Lipofectamine (Invitrogen) was added and the mixture was incubated for another 15 min. The transfection solution was added to the cells and after 48 h expression was analyzed by immunoblotting. Briefly, proteins were subjected to electrophoresis on SDS-PAGE and after being transferred to nitrocellulose membrane followed by incubation with anti-Flag antibody. Detection was performed using secondary antibodies conjugated with peroxidase, SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) and exposition to Hyperfilm (Amersham Biosciences). As can be seen in Fig. 1B, the expression was strong for the three genes and similar to that obtained for optimized N and P genes cloned into the pShuttle vector (Simabuco et al., 2009).

For immunoprecipitation, 48 h after transfection, proteins were extracted using Cell Lysis Buffer (Cell Signaling) containing protease and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma). Cell debris was removed by centrifugation and the supernatant subjected to immunoprecipitation with anti-Flag antibody coupled to agarose beads (Sigma). Briefly, after 16 h, agarose beads were washed 5 times with TBS and proteins were eluted with Flag peptide (150 ng/μl). Eluted proteins of the immunoprecipitation were separated on SDS-PAGE, stained with Coomassie blue (Supplementary Figure 2) and the differentially expressed proteins were excised, trypsinized and analyzed in a MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems). Mass spectrometry was performed at the BIDMC Genomics Center/DFHCC Proteomics Core, Boston, USA. The peptides were identified using Protein Pilot software (Applied Biosystems) and the SwissProt database. Table 1 summarizes the data for the selected human proteins with higher confidence scores. All identified proteins presented ProtScores above 2.0, which represent, by definition, a confidence above 99%.

Fig. 1. Immunoprecipitation of HRSV Flag-tagged N, P or M co-immunoprecipitates cellular proteins. (A) Representation of experimental rationale. (B) Expression of Flag tagged proteins. HEK293T cells were transfected with plasmids pFlag (Ctl), pFlagMopt (M), pFlagNopt (N) or pFlagPopt (P), collected after 48 h, cell lysates subjected to SDS-PAGE, and the Western Blot result is presented for detection (IB) with antibodies against the FLAG tag. (C) HEK293T cells were transfected with plasmids pFlag (Ctl), pFlagMopt (M), pFlagNopt (N) or pFlagPopt (P), and collected after 48 h. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody (IP) and subjected to SDS-PAGE (indicated on top). The Western Blot results are presented for detection with specific antibodies (see text) against Hsp70, Npm, PRMT5, WDR77 or Tm, as indicated (IB). The expected molecular weight of proteins is indicated by arrows.

Table 1
Co-immunoprecipitated cellular proteins mass spectrometry identification.

IP/band ^a	Identified proteins	Species	ProtScore (unused)	ProtScore (total)	% Cov.	% Cov. (95)	MW (kDa)
M/3	M Protein	HRSV A2	11.5	11.5	53.9	31.6	29
M/2	Tropomyosin alpha-3 chain (TPM)	<i>Homo sapiens</i>	15.73	15.73	57.4	20.8	36
M/1	Nucleophosmin (NPM)	<i>Homo sapiens</i>	9.16	9.16	35.4	20.7	38
N/5	N Protein	HRSV A2	35.13	35.13	66.2	51.4	43
N/4	Protein Arginine N-Methyltransferase 5 (PRMT5)	<i>Homo sapiens</i>	29.77	29.77	58.0	27.8	72
N/4	Heat Shock Protein 70 (HSP70)	<i>Homo sapiens</i>	16.12	16.12	45.5	15.7	70
N/6	Methylosome protein (MEP50, WDR77)	<i>Homo sapiens</i>	9.15	9.15	48.2	16.4	42
N/7	Nucleophosmin (NPM)	<i>Homo sapiens</i>	8.08	8.08	31.9	15.6	38
P/9	P Protein	HRSV A2	69.26	69.26	98.8	71.1	33
P/8	Heat Shock Protein 70 (HSP70)	<i>Homo sapiens</i>	54.58	54.58	70.0	52.1	70

Mass spectrometry data were searched against the SwissProt protein database using the ProteinPilot software (Applied Biosystems). ProtScore (unused) is a measure of the unique peptide evidence related to a given protein. ProtScore (total) is a measure of the total amount of evidence for a detected protein. The total coverage (% Cov.) and the coverage of peptides with confidence higher than the cut-off of 95 (% Cov. 95) are presented.

^a As indicated in Supplementary Figure 2.

In order to validate these findings HEK293T cells were transfected with pFlagMopt, pFlagNopt, pFlagPopt and pFlag, and proteins immunoprecipitated with anti-Flag antibody were subjected to immunoblotting, as described above. Specific antibodies used to detect cellular proteins were: anti-Hsp70, anti-Npm (Sigma–Aldrich), and anti-Tm, anti-PRMT5 or anti-WDR77 (Santa Cruz Biotechnology). Detection was performed as described above. The results shown in Fig. 1C confirm the mass spectrometry findings (Table 1), with the exception of non Npm co-immunoprecipitation with N (not shown), and with the additional detection of Tm co-immunoprecipitated with P. The scanning of the full autoradiography of original Figure 1C Western Blots is available in Supplementary Figure 3 (S3 A–E).

HRSV was grown in HEK-293T cells to demonstrate that the interactions described also occur in infected cells during virus replication. Cells were infected with one MOI of HRSV and 48 h post infection the lysates were treated with G-Sepharose for pre cleaning, and then one of the following antibodies was added to the supernatant: anti-Hsp70, anti-Npm (Sigma–Aldrich), anti-Tm, anti-PRMT5 or anti-WDR77 (Santa Cruz Biotechnology). After 1 h (shaking at 4 °C) G-Sepharose was added for an equal period. The complexes G-Sepharose-Antibody-proteins were collected by centrifugation, washed with PBS; proteins were eluted and analyzed by immunoblotting with primary polyclonal antibodies raised in mice against recombinant M, N or P proteins. Anti M was produced against a His-tagged M expressed in bacteria using the optimized M gene cloned in pET28b (Novagen). Anti N and P production was previously described (Simabuco et al., 2007).

As observed in Fig. 2A, N was co-immunoprecipitated with Hsp70 and WDR77; M with Npm and Tm; P with Hsp70 and Tm. The scanning of the full autoradiography of original figure 2A Western Blots is available in Supplementary Figure 4 (S4 A–F). A control experiment to show the specificity of immunoprecipitation and detection of the viral proteins (avoiding unspecific pull down by G-Sepharose and detection by the anti viral proteins sera) is shown in Supplementary figure 5. These results confirm the interactions observed in Fig. 1C; however, N co-immunoprecipitation with PRMT5 was not observed (not shown). Since PRMT5 and WDR77 (MEP50) are partners in the methylosome complex (Friesen et al., 2002; Krause et al., 2007), we decided to evaluate whether this interaction occurs in HEK293T cells. Cell extracts were immunoprecipitated with anti-WDR77 and probed with anti-PRMT5, and as observed in Fig. 2B, PRMT5 was detected in our experimental conditions. The scanning of the full autoradiography of original Fig. 2B Western Blot is shown in Supplementary Figure 4G. These data indicate that the interaction of PRMT5 with N may be mediated by WDR77.

Brasier et al. (2004) were the first to show the relationship between HRSV and Hsp70. The authors demonstrated that a heat

shock response is induced in HRSV infected cells, increasing the expression level of Hsp70 and altering its subcellular localization. The interaction between Hsp70 and the HRSV replication complex was shown by Brown et al. (2005). These authors demonstrated that Hsp70 is localized in inclusion bodies in HRSV infected cells and co-immunoprecipitates with the HRSV polymerase complex. Although the authors did not demonstrate which protein is responsible for the interaction, they suggested that the interaction is mediated by the N protein. In their N protein immunoprecipitation experiments, the P protein was immunoprecipitated together with the N, M2-1 and Hsp70 proteins, which does not exclude an interaction between Hsp70 and the P protein. Importantly, in this study, we provide experimental evidence that both N and P proteins interact with Hsp70 (Figs. 1C and 2A). However, the possibility that other HRSV replication complex proteins interact with Hsp70 cannot be ruled out.

HRSV N protein expressed alone interacts non-specifically with RNAs, forming structures similar to nucleocapsids (Murphy et al., 2003) and the non-specific interaction with RNAs can be prevented by P protein interaction (Castagné et al., 2004). The fast and weak binding kinetics of N and P proteins facilitates the movement of the polymerase complex (L and P proteins) along the nucleocapsid template (RNA and N) for Measless virus (Kingston et al., 2004). However, conformational changes in the N–P complex are necessary for encapsidation and to allow RNA template to be brought to the polymerase active site (Cowton et al., 2006). The dissection of the N and P proteins interaction with Hsp70 warrants further study in order to clarify its putative role in HRSV replication. The localization of Hsp70 in inclusion bodies (Brown et al., 2005 and data reported here) supports the notion that the Hsp70 recruitment for the encapsidated viral RNA may help in the N–P action to allow exposure of viral RNA to RNA synthesis by the L protein. Supporting this model, Zhang et al. (2002) demonstrated that Measles virus replication and transcription is stimulated by Hsp72, which interacts with an N protein regulatory domain. More recently, Lahaye et al. (2012) have shown that Hsp70 has a role in the control of Rabies virus replication. The interaction of heat shock proteins with other virus replication complexes such as HIV-1, HBV, hantavirus and HCV (Iordanskiy et al., 2004; Liu et al., 2009; Yu et al., 2009; Chen et al., 2010) also points in this direction.

Protein arginine methyl-transferases have been extensively studied and are responsible for the methylation of arginine residues in several cellular proteins, leading to important regulatory events (Krause et al., 2007). Protein arginine methyl-transferase-5 (PRMT5) works in conjunction with the cellular proteins WDR77 (p44 or Mep50) and pICln forming the methylosome complex (Friesen et al., 2002). Proteins involved in processing, transport and stability of mRNA are methylated by PRMT5 (Yu et al., 2004). PRMT5 also plays an important role in spliceosome assembly

Fig. 2. Immunoprecipitation of Hsp70, Npm, WDR77 or Tm co-immunoprecipitates HRSV proteins from HRSV infected cells. (A) HEK 293T cells were infected with HRSV or not (N.I.) and collected after 48 h. Aliquots of these cell lysates were immunoprecipitated (IP) with specific antibodies against Hsp70, Npm, PRMT5, WDR77 or Tm, as indicated and subjected to SDS-PAGE. The Western Blot results are presented for detection with specific antibodies against M, N or P proteins (see text), as indicated (IB). The expected molecular weight for the viral proteins is indicated by arrows on the right. (B) An aliquot of HEK 293T cells lysate was immunoprecipitated (IP) with antibodies against WDR77, subjected to SDS-PAGE, and the Western Blot result is presented for detection with antibodies against PRMT5 (IB).

and in the methylation of histones H4 and H2A (Krause et al., 2007). In this study we have shown that PRMT-5 and WDR77 co-immunoprecipitate with N protein (Fig. 1C), however N co-immunoprecipitates only with WDR77 (Fig. 2A) and not PRMT-5 (not shown). In addition, we demonstrated that PRMT-5 and WDR77 interact in HEK293T cells (Fig. 2B). In this context we can explain PRMT5 co-immunoprecipitation with N (Fig. 1C) by a sequential N/WDR77/PRMT-5 interaction. These data point to the recruitment of the methylosome to the HRSV replication complex, and the methylation targets could be N, P, M2-1 or L proteins, leading to modulation of their activities.

Nucleophosmin (Npm, B23) is a highly conserved and an abundant phosphoprotein expressed in all cells, and has important roles in many cellular processes (Chang and Olson, 1990). It is located mainly in the nucleolus, but is able to migrate rapidly between the nucleus and the cytoplasm (Borer et al., 1989). Npm has chaperone activity (Szebeni and Olson, 1999) and plays a key role in proper transport of ribosome components from the nucleus to the cytoplasm, preventing aggregation of proteins during ribosome assembly (Yu et al., 2006). The hepatitis C virus recruits Npm during its replication (Mai et al., 2006), and Npm participates in the adenovirus assembly process in HeLa cells (Bevington et al., 2007). These data indicate that HRSV M protein may be recruiting Npm (Figs. 1C and 2A) to assist its assembly process. In support of this, recently it has been shown that M links the viral envelope to the nucleocapsid playing a vital role in viral budding and viability (Mitra et al., 2012).

Another protein identified to interact with M protein, and with P with lower efficiency, was tropomyosin (Tm). Tm is important to the organization of the cytoskeletal microfilaments, especially by stabilizing F-actin (Bernstein and Bamburg, 1982; Hitchcock-DeGregori et al., 1988; Broschat, 1990). In non-muscle cells multiple isoforms of Tm are expressed and participate in various cellular events that involve the formation of cytoskeleton (Gunning et al., 2008; Wang and Coluccio, 2010). F-actin plays a pivotal role in HRSV replication, assembly and budding (Burke et al., 1998; Kallewaard et al., 2005; Jeffree et al., 2007), and its rearrangement in infected cells has been related to PI3K, Rac GTPase (Jeffree et al., 2007), p38 MAPK and Hsp27 (Singh et al., 2007). In the

absence of tropomyosin, filamentous-actin (F-actin) can be targeted by cofilin, severed and branched (Ono and Ono, 2002). In this report, we demonstrate that M and P proteins interact with Tm by co-immunoprecipitation assays (Figs. 1C and 2A). Our hypothesis is that the cellular microfilament alteration associated with HRSV replication is due to the sequestering of tropomyosin by M and P, leading to relaxation, or re-orientation of the cytoskeletal organization to favor virus budding.

In the present work we have screened the cell interaction partners of two main proteins of the virus replication complex, N and P, and of M, the matrix protein. It was successfully shown that N interacts with PRMT5, WDR77 and Hsp70. P interacts with Hsp70 and Tm, and M interacts with Tm and Npm. Even though more functional studies are required, all these cellular proteins are likely to play a role in the virus replication-transcription processes, as well as in the virus assembly and budding as discussed above.

Acknowledgments

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (proc. # 2009/17587-9) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (proc. # 477734/2009-0). A.P.O. has doctoral degree fellowship from FAPESP.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.07.010>.

References

- Bernstein, B.W., Bamburg, J.R., 1982. Tropomyosin binding to F-actin protects the F-actin from disassembly by brain actindepolymerizing factor (ADF). *Cell Motility* 2, 1–8.
- Bevington, J.M., Needham, P.G., Verrill, K.C., Collaco, R.F., Basrur, V., Trempe, J.P., 2007. Adeno-associated virus interactions with B23/nucleophosmin identification of sub-nucleolar virion regions. *Virology* 357, 102–113.

- Borer, R.A., Lehner, C.F., Eppenberger, H.M., Nigg, E.A., 1989. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56, 379–390.
- Bowman, M.C., Smallwood, S., Moyer, A., 1999. Dissection of individual functions of the Sendai virus phosphoprotein in transcription. *Journal of Virology* 73, 6474–6483.
- Brasier, A.R., Spratt, H., Wu, Z., Boldogh, I., Zhang, Y., Garofalo, R.P., Casola, A., Pashmi, J., Haag, A., Luxon, B., Kurosky, A., 2004. Nuclear heat shock response and novel nuclear domain 10 reorganization in respiratory syncytial virus-infected a549 cells identified by high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Virology* 78, 11461–11476.
- Broschat, K.O., 1990. Tropomyosin prevents depolymerization of actin filaments from the pointed end. *Journal of Biological Chemistry* 265, 21323–21329.
- Brown, G., Rixon, H.W., Steel, J., McDonald, T.P., Pitt, A.R., Graham, S., Sugrue, R.J., 2005. Evidence for an association between heat shock protein 70 and the respiratory syncytial virus polymerase complex within lipid-raft membranes during virus infection. *Virology* 338, 69–80.
- Burke, E., Dupuy, L., Wall, C., Barik, S., 1998. Role of cellular actin in the gene expression and morphogenesis of human respiratory syncytial virus. *Virology* 252, 137–148.
- Castagné, N., Barbier, A., Bernard, J., Rezaei, H., Huet, J.C., Henry, C., Da Costa, B., Eléouët, J.F., 2004. Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P–P and P–N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain. *Journal of General Virology* 85, 1643–1653.
- Chang, J.H., Olson, M.O., 1990. Structure of the gene for rat nucleolar protein B23. *Journal of Biological Chemistry* 265, 18227–18233.
- Carroumeu, C., Simabuco, F.M., Tamura, R.E., Farinha Arcieri, L.E., Ventura, A.M., 2007. Intracellular localization of human respiratory syncytial virus L protein. *Archives of Virology* 152, 2259–2263.
- Chen, Y.J., Chen, Y.H., Chow, L.P., Tsai, Y.H., Chen, P.H., Huang, C.Y., Chen, W.T., Hwan, L.H., 2010. Heat shock protein 72 is associated with the hepatitis C virus replicase complex and enhances viral RNA replication. *Journal of Biological Chemistry* 285, 28183–28190.
- Collins, P.L., Chanock, R.M., Murphy, B.R., 2001. Respiratory syncytial virus. In: Fields, B.N., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E., Knipe, D.M. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1443–1485.
- Collins, P.L., Melero, J.A., 2011. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. *Virus Research* 162, 80–99.
- Cowton, V.M., McGovern, D.R., Fearn, R., 2006. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. *Journal of General Virology* 87, 1805–1821.
- Friesen, W.J., Wyce, A., Paushkin, S., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., Dreyfuss, G., 2002. A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins. *Journal of Biological Chemistry* 277, 8243–8247.
- Ghildyal, R., Mills, J., Murray, M., Vardaxis, N., Meanger, J., 2002. Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. *Journal of General Virology* 83, 753–757.
- Ghildyal, R., Baulch-Brown, C., Mills, J., Meanger, J., 2003. The matrix protein of Human respiratory syncytial virus localises to the nucleus of infected cells and inhibits transcription. *Archives of Virology* 148, 1419–1429.
- Gunning, P., O'Neill, G., Hardeman, E., 2008. Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. *Physiological Reviews* 88, 1–35.
- Hall, C.B., Powell, K.R., Macdonald, N.E., Gala, C.L., Menegus, M.E., Suffin, S.C., Cohen, H.J., 1986. Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function. *New England Journal of Medicine* 315, 77–81.
- Han, L.L., Alexander, J.P., Anderson, L.J., 1999. Respiratory syncytial virus pneumonia among the elderly: an assessment of disease burden. *Journal of Infectious Diseases* 179, 25–30.
- Hitchcock-DeGregori, S.E., Sampath, P., Pollard, T.D., 1988. Tropomyosin inhibits the rate of actin polymerization by stabilizing actin filaments. *Biochemistry* 27, 9182–9185.
- Holberg, C.J., Wright, A.L., Martinez, F.D., Ray, C.G., Taussig, L.M., Lebowitz, M.D., 1991. Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses in the first year of life. *American Journal of Epidemiology* 133, 1135–1151.
- Iordansky, S., Zhao, Y., DiMarzio, P., Agostini, I., Dubrovsky, L., Bukrinsky, M., 2004. Heat-shock protein 70 exerts opposing effects on Vpr-dependent and Vpr-independent HIV-1 replication in macrophages. *Blood* 104, 1867–1872.
- Jeffree, C.E., Brown, G., Aitken, J., Su-Yin, D.Y., Tan, B.H., Sugrue, R.J., 2007. Ultrastructural analysis of the interaction between F-actin and respiratory syncytial virus during virus assembly. *Virology* 369, 309–323.
- Kallewaard, N.L., Bowen, A.L., Crowe Jr., J.E., 2005. Cooperativity of actin and microtubule elements during replication of respiratory syncytial virus. *Virology* 331, 73–81.
- Kim, H.W., Canchola, J.G., Brandt, C.D., Pyles, G., Chanock, R.M., Jensen, K., Parrot, R.H., 1969. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *American Journal of Epidemiology* 89, 422–434.
- Kingston, R.L., Hamel, D.J., Gay, L.S., Dahlquist, F.W., Matthews, B.W., 2004. Structural basis for the attachment of a paramyxoviral polymerase to its template. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 8301–8306.
- Krause, C.D., Yang, Z.H., Kim, Y.S., Lee, J.H., Cook, J.R., Pestka, S., 2007. Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacology & Therapeutics* 113, 50–87.
- Lahaye, X., Vidy, A., Fouquet, B., Blondel, D., 2012. Hsp70 protein positively regulates rabies virus infection. *Journal of Virology* 86, 4743–4751.
- Lemanske, R.F., 2004. Viral infections and asthma inception. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114, 1023–1026.
- Li, D., Jans, D.A., Bardin, P.G., Meanger, J., Mills, J., Ghildyal, R., 2008. Association of respiratory syncytial virus M protein with viral nucleocapsids is mediated by the M2-1 protein. *Journal of Virology* 82, 8863–8870.
- Liu, S.K., Qian, L., Wang, J., Li, W., Deng, X., Chen, X., Sun, W., Wei, H., Qian, X., Jiang, Y., He, F., 2009. Two-dimensional blue native/SDS-PAGE analysis reveals heat shock protein chaperone machinery involved in hepatitis B virus production in HepG2.2.15 cells. *Molecular & Cellular Proteomics* 8, 495–505.
- MacLellan, K., Loney, C., Yeo, R.P., Bhella, D., 2007. The 24-angstrom structure of respiratory syncytial virus nucleocapsid protein-RNA decameric rings. *Journal of Virology* 81, 9519–9524.
- Mai, R.T., Yeh, T.S., Kao, C.F., Sun, S.K., Huang, H.H., Wu Lee, Y.H., 2006. Hepatitis C virus core protein recruits nucleolar phosphoprotein B23 and coactivator p300 to relieve the repression effect of transcriptional factor YY1 on B23 gene expression. *Oncogene* 25, 448–462.
- Mitra, R., Baviskar, P., Duncan-Decocq, R.R., Patel, D., Oomens, A.G., 2012. The human respiratory syncytial virus matrix protein is required for maturation of viral filaments. *Journal of Virology* 86, 4432–4443.
- Murphy, L.B., Loney, C., Murray, J., Bhella, D., Ashton, P., Yeo, R.P., 2003. Investigations into the amino-terminal domain of the respiratory syncytial virus nucleocapsid protein reveal elements important for nucleocapsid formation and interaction with the phosphoprotein. *Virology* 307, 143–153.
- Ono, S., Ono, K., 2002. Tropomyosin inhibits ADF/cofilin-dependent actin filament dynamics. *Journal of Cell Biology* 156, 1065–1076.
- Schmidt, A.C., Johnson, T.R., Openshaw, P.J.M., Braciale, T.J., Falsey, A.R., Anderson, L.J., Wertz, G.W., Groothuis, J.R., Prince, G.A., Melero, J.A., Graham, B.S., 2004. Respiratory syncytial virus and other pneumoviruses: a review of the international symposium – RSV 2003. *Virus Research* 106, 1–13.
- Simabuco, F.M., Tamura, R.E., Carroumeu, C., Farinha-Arcieri, L.E., Ventura, A.M., 2009. Gene optimization leads to robust expression of human respiratory syncytial virus nucleoprotein and phosphoprotein in human cells and induction of humoral immunity in mice. *Journal of Virological Methods* 158, 93–99.
- Simabuco, F.M., Carroumeu, C., Farinha-Arcieri, L.E., Tamura, R.E., Ventura, A.M., 2007. Production of polyclonal antibodies against the human respiratory syncytial virus nucleoprotein and phosphoprotein expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 53, 209–215.
- Singh, D., McCann, K.L., Imani, F., 2007. MAPK and heat shock protein 27 activation are associated with respiratory syncytial virus induction of human bronchial epithelial monolayer disruption. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology* 293, 436–445.
- Spehner, D., Drillien, R., Howley, P.M., 1997. The assembly of the measles virus nucleoprotein into nucleocapsid-like particles is modulated by the phosphoprotein. *Virology* 232, 260–268.
- Szebeni, A., Olson, M.O., 1999. Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Science* 8, 905–912.
- Wang, A.C.L., Coluccio, L.M., 2010. New insights into the regulation of the actin cytoskeleton by tropomyosin. *International Review of Cell & Molecular Biology* 281, 91–128.
- Yu, M.C., Bachand, F., McBride, A.E., Komili, S., Casolari, J.M., Silver, P.A., 2004. Arginine methyltransferase affects interactions and recruitment of mRNA processing and export factors. *Genes & Development* 18, 2024–2035.
- Yu, Y., Maggi Jr., L.B., Brady, S.N., Apicelli, A.J., Dai, M.S., Lu, H., Weber, J.D., 2006. Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export. *Molecular and Cellular Biology* 26, 3798–3809.
- Yu, L., Ye, L., Zhao, R., Liu, Y.F., Yang, S.J., 2009. HSP70 induced by Hantavirus infection interacts with viral nucleocapsid protein and its overexpression suppresses virus infection in Vero E6 cells. *American Journal of Translational Research* 1, 367–380.
- Zhang, X., Glendening, C., Linke, H., Parks, C.L., Brooks, C., Udem, S.A., Oglesbee, M., 2002. Identification and characterization of a regulatory domain on the carboxyl terminus of the measles virus nucleocapsid protein. *Journal of Virology* 76, 8737–8746.

Appendix A. Supplementary data – Oliveira et al. (2013)

Supplementary Fig. 1. Optimized genes.

M gene:

ATGGAAACCTACGTGAACAAGCTGCACGAGGGCAGCACCTACACAGCCGCCGTGCAGTACAACGTGCTGGAAAAGGACG
ACGACCCCGCCAGCCTGACCATCTGGGTGCCCATGTTCCAGAGCAGCATGCCCGCCGACCTGCTGATCAAAGAACTGGCC
AACGTGAACATCCTGGTGAAGCAGATCAGCACCCCAAGGGCCCCAGCCTGCGGGTGATGATCAACAGCCGGTCCGCCGT
GCTGGCCCAGATGCCAGCAAGTTCACCATCTGCGCCAACGTGAGCCTGGACGAGCGGAGCAAGCTGGCCTACGACGTG
ACCACCCCTGCGAGATCAAGGCCTGCAGCCTGACCTGCCTGAAGAGCAAGAACATGCTGACCACCGTGAAGGACCTGAC
CATGAAAACCTGAACCCACCCACGACATCATCGCCCTGTGCGAGTTTCGAGAACATCGTGACCAGCAAGAAGGTGATCA
TCCCCACCTACCTGCGGAGCATCAGCGTGCGGAACAAGGACCTGAACACCTGGAAAACATCACCACCACCGAGTTCAAG
AACGCCATACCAACGCCAAGATCATCCCTACAGCGGCCTGCTGCTGGTGATCACCGTGACCGACAACAAGGGCGCCTTC
AAGTACATCAAGCCCCAGAGCCAGTTCATCGTGACCTGGGCGCCTACCTGGAAAAAGAGTCCATCTACTACGTCAACACC
AACTGGAAGCACACCGCCACCCGGTTCGCCATCAAGCCCATGGAAGAT

N gene:

ATGGCCCTGAGCAAGGTGAACTGAACGACACCCTGAACAAGGACCAGCTGCTGTCCAGCAGCAAGTACACCATCCAGCG
GAGCACCGGCGACAGCATCGACACCCCAACTACGACGTGCAGAAGCACATCAACAAGCTGTGCGGCATGCTGCTGATCA
CCGAGGACGCCAACCACAAGTTCACCGGCCTGATCGGCATGCTGTACGCCATGAGCCGGCTGGGCCGGGAGGACACCAT
CAAGATCCTGCGGGACGCCGGTACCACGTGAAGGCCAACGGCGTGGACGTGACCACCCACCGGCAGGACATCAACGGC
AAAGAGATGAAGTTCGAGGTCTGACCCTGGCCAGCCTGACCACCGAGATCCAGATCAACATCGAGATCGAGAGCCGGA
AGAGCTACAAGAAAATGCTGAAAGAAAATGGGCGAGGTGGCCCCGAGTACCGGCACGACAGCCCCGACTGCGGCATGAT
CATCCTGTGCATCGCCGCCCTGGTGATTACCAAGCTGGCTGCCGCGACAGAAGCGGCCTGACCGCCGTATCAGGCGGG
CCAACAACGTGCTGAAGAACGAGATGAAGCGGTACAAGGGCCTGCTGCCAAGGACATCGCCAACAGCTTCTACGAGGT
GTTTCGAGAAGCACCCCACTTCATCGACGTGTTCTGTCATTCGCGCATCGCCAGAGCAGCACCAGAGGCGGCAGCCGGG
TGGAGGGCATCTTCGCCGCCCTGTTTATGAACGCCTATGGCGCCGGACAGGTCATGCTGCGGTGGGGCGTGCTGGCCAA
GAGCATCAAGAACATCATGCTGGGCCACGCCAGCGTGACGGCCGAGATGGAACAGGTGGTGGAGGTGTACGAGTACGC
CCAGAAGCTGGGCGGCGAGGCCGGCTTCTACCACATCCTGAACAACCCCAAGGCCTCCCTGCTGTCCCTGACCCAGTCCC
CCACTTCTCCAGCGTGGTGCTGGGCAATGCCGCCGACTGGGCATCATGGGCGAGTACAGAGGCACCCCCCGGAACCAG
GACCTGTACGACGCCCAAGGCCTACGCCGAGCAGCTGAAAGAAAACGGCGTGATCAACTACAGCGTGCTGGATCTGA
CCGCCGAGGAAGTGAAGCCATCAAGCACCAGCTGAACCCCAAGGACAACGACGTGGAGCTG

P gene:

ATGGAAAAGTTCGCCCCGAGTTCACGGCGAGGACGCCAACAACCGGGCCACCAAGTTTCTGGAAAGCATCAAGGGCA
AGTTCACCAGCCCCAAGGACCCCAAGAAGAAGGACAGCATCATCAGCGTGAACAGCATCGACATCGAGGTGACCAAAGA
GAGCCCCATCACCAGCAACAGCACCATCATCAACCCACCAACGAGACCGACGACACCGCCGGCAACAAGCCCACTACC
AGCGGAAGCCCCTGGTGTCTTCAAAGAAGATCCACACCCAGCGACAACCCCTTCAGCAAGCTGTACAAAGAGACCATC
GAGACCTTCGACAACAACGAGGAAGAGAGCAGCTACAGCTACGAGGAAATCAACGACCAGACCAACGACAACATCACCG
CCAGGCTGGACCGGATCGACGAGAAGCTGTCCGAGATCCTGGGCATGCTGCACACCCTGGTGGTGGCCAGCGCCGGACC
TACCTCTGCCAGGGACGGCATCCGGGACGCCATGGTCGGCCTGCGGGAGGAAATGATCGAGAAGATCCGGACCGAGGCC
CTGATGACCAACGACCGGCTGGAAGCTATGGCCAGACTGCGGAACGAGGAAAGCGAGAAGATGGCCAAGGACACCAGC
GACGAGGTGTCCCTGAACCCACCTCCGAGAAGCTGAACAACCTGCTGGAAGGCAACGACAGCGACAACGACCTGAGCCT
GGAAGATTTC

Nucleotide sequences of HRSV A2 virus M, N and P genes are shown. These sequences were codon optimized for expression in *Homo sapiens* and synthesized by GeneArt®.

Supplementary Fig. 2. Immunoprecipitation of FLAG-tagged proteins.

HEK293 cells were transfected with pFlag, pFlagMopt, pFlagNopt or pFlagPopt, and after 48 hrs proteins were extracted. Protein extracts were submitted to immunoprecipitation (see text) using an anti-FLAG antibody coupled with agarose beads (Sigma). A polyacrilamide gel, stained with Coomassie blue is shown. The chosen gel bands for excision and mass spectrometry analysis were numbered as indicated for FLAG-M, N or P immunoprecipitations.

Supplementary Fig. 3. Full figure of 1C Western Blots.

The full autoradiography of each Western Blot shown in figure 1C is presented in sequence from top (S3A) to bottom (S3E). The expected position of the detected protein is indicated by an arrow on the right.

Supplementary Fig. 4. Full figure of 2 Western Blots.

G

The full autoradiography of each Western Blot shown in figure 2A (S4A to S4F) and 2B (S4G) are presented. The antibodies used for immunoprecipitation (IP) and immunoblotting (IB) are indicated on left top of each figure, for correspondence with figure 2. The expected position of the detected protein is indicated by an arrow on the right.

Supplementary Fig. 5. Specificity of viral proteins detection after pull down in infected cells.

HEK 293T cells were infected with HRSV or not (N.I.) and collected after 48 hours. Aliquots of these cell lysates were incubated with G-Sepharose and submitted to Western Blot detection by the anti viral proteins sera (IB:M, N or P) as described for figure 2A. An aliquot of purified virus was included as a positive control on each blot. Note that the unspecific bands detected by each serum are not coincident with the virus detected proteins.

ANEXO

Curriculum Vitae – Resumido

1. Formação

2006 - 2008 Mestrado em Microbiologia Agropecuária.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil

Título: Expressão da Proteína S1 Recombinante do Vírus da Bronquite Infecciosa em *Saccharomyces cerevisiae* Para Aplicação No Imunodiagnóstico, Ano de obtenção: 2008

Orientador: Hélio José Montassier

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2002 - 2005 Graduação em Ciências Biológicas.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil

Título: Padronização da Técnica de Eletroforese Bidimensional para Análise Proteômica de *Xanthomonas Axonopodis* pv. citri

Orientador: Maria Inês Tiraboschi Ferro

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

1997 - 1999 Ensino Profissional de nível técnico.

Colégio Nossa Senhora de Lourdes, CNSL, Brasil

2. Artigos aceitos para publicação

1. Oliveira AP, Simabuco FM, Tamura RE, Guerrero MC, Ribeiro PG, Libermann TA, Zerbini LF, Ventura AM. Human Respiratory Syncytial Virus N, P and M protein interactions in HEK-293T cells. Virus Research (Print), 2013.

3. Trabalho apresentado em reuniões científicas

- 1 Homen, Rafael; BELOTI, Lillian; Fernandes, Camila; Oliveira, A. P; Marini, Rafael. Projeto Genoma Funcional da bactéria causadora do Cancro cítrico, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*., 2003. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
- 2 Oliveira, A. P. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: Estudo de um mutante com patogenicidade alterada, 2003. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
- 3 Fancicani Agda; Oliveira, Júlio Cezar Franco; Oliveira, Andressa Peres de ; Ferreira, Rafael Marini; Ferro, Jesus Aparecido; Ferro, Maria Inês Tiraboschi. Cancro Cítrico: Análise Proteômica em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e em seus mutantes. In: Congresso brasileiro de Genética, 2003, Águas de Lindóia - SP, 2003. In: Congresso de genética, 2003.
- 4 Oliveira, A. P., Gibertoni, A.M., Montassier, M.F.S., Caetano, A.G., Montassier, H.J. Clonagem e Expressão da Proteína S1 Recombinante do Vírus da Bronquite Infecciosa (VBI) em *Saccharomyces cerevisiae* In: 20º RAIB, 2007, São Paulo. RAIB. , 2007. v.69. p.113 - 198
- 5 Okino, C.H., Oliveira, A. P., Montassier, H.J. Detecção e diferenciação de genotipos do vírus da bronquite infecciosa das galinhas em oito grupos por RT-PCR em tempo real In: 20. Reunião Anual do Instituto Biológico, 2007, São Paulo. RAIB XX. , 2007. v.69. p.118 – 118
- 6 Oliveira, A. P., Montassier, M.F.S., Gibertoni, A.M., Caetano, A.G., Montassier, H.J. Clonagem e Expressão da Proteína S1 Recombinante do Vírus da Bronquite Infecciosa (VBI) Em *Saccharomyces cerevisiae*, 2007. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
- 7 Oliveira, A. P., Gibertoni, A.M., Caetano, A.G., Montassier, M.F.S., Montassier, H.J. Cloning and Expression of S1 Glycoprotein of Infectious Bronchitis Virus (IBV) in *Saccharomyces cerevisiae*, 2007. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

- 8 Oliveira, A. P., Simabuco F.M., Tamura R.E., Arcieri L. Farinha, Armenteros Y.M., Zerbini L.F., Libermann T. A., Ventura A.M. Identification of Cell Protein that Interact with Human respiratory syncytial virus matrix, nucleo ans phospho protein, 2010.
- 9 Oliveira, A. P., Ribeiro, P.G.G., Simabuco F.M., Tamura R.E., Ventura A.M. Virus-Cell Protein Interactions in Human Respiratory Syncytial Virus Infected HEK-293T Cells, 2011.

4. Estágios

1. Estágio realizado no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino – PAE no curso de Medicina junto à disciplina de Microbiologia Básica, código BMM-280 sem/ano 1º semestre – 2010. Total de créditos: 8.
2. Estágio realizado no Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) - Virology and Immunolgy laboratory (VIM), Jouy-en-Josas, no período de 2/11/2012 to 30/04/2013 sob co-orientação do Dr Jean-François Éléouët.