

GUILHERME PEREIRA SCAGION

**A PROTEÍNA ARFGAP COM DOIS DOMÍNIOS PLAQUISTRINOS
2 (ADAP2) NO SISTEMA IMUNE INATO DE GALINHAS**

São Paulo

2020

GUILHERME PEREIRA SCAGION

**A PROTEÍNA ARFGAP COM DOIS DOMÍNIOS PLAQUISTRINOS
2 (ADAP2) NO SISTEMA IMUNE INATO DE GALINHAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:


Prof. Dr. Helena Lage Ferreira

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3971
FMVZ

Scagion, Guilherme Pereira
A proteína ArfGAP com dois domínios plaquitrinos 2 (ADAP2) no sistema imune inato de galinhas / Guilherme Pereira Scagion. – 2020.
163 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Lage Ferreira.

1. ADAP2. 2. Sistema imune de galinhas. 3. Grânulos de estresse. 4. Interferon. 5. Antiviral. I. Título.



Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Helena Lage Ferreira

Área: Epidemiologia Experimental Aplicada As Zoonoses

Título do projeto: "A proteína ArfGAP com dois domínios plaquistrinos 2 (ADAP2) no sistema imune inato de galinhas".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 000892)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, **ANALISOU e APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 08/outubro/2019) do protocolo de estudo acima referenciado.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Venho por meio deste solicitar a alteração do título do projeto intitulado "Avaliação da expressão gênica de ISGs na resposta imune de células DF-1, após coinfeção com aMPV e NDV in vitro, CEUAX N° 8346300316 registrado em: 30/03/2016, para [A proteína ArfGAP com dois domínios plaquistrinos 2 (ADAP2) no sistema imune inato de galinhas]. Durante a execução do projeto de doutorado, houve um problema em relação ao fornecimento da linhagem do cultivo celular, bem como a mudança de um dos principais colaboradores deste projeto para outra instituição na Inglaterra o que culminou em atrasos e falta de alguns importantes materiais. Dessa forma, o enfoque do projeto precisou ser alterado, e o título que foi utilizado para cadastro do CEUA não condiz mais com o estudo atual.

Atenciosamente,
Helena".

Comentários da CEUA: "Alteração de título solicitada aprovada".

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coodenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

RESUMO

SCAGION, G. P. A Proteína ArfGAP com dois domínios plaquistrinos 2 (ADAP2) no sistema imune inato de galinhas. 2020. 163p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Aves e mamíferos possuem algumas semelhanças em seu sistema imune inato, porém também apresentam diferenças pela sua divergência evolutiva. Alguns componentes da via do interferon (IFN) estão ausentes em células de galinha, como o gene RIG-I, IRF 3 e IRF 9. Outros componentes são únicos na resposta imune inata das galinhas, como o gene do receptor do tipo Toll 15 (TLR15). A via do IFN tipo I, ativa os genes estimulados por IFN (ISGs), os quais possuem um importante papel contra os vírus, estabelecendo o estado antiviral no hospedeiro. No entanto, os mecanismos moleculares dessa indução em aves são pouco compreendidos e podem ser evolutivamente distintos dos mamíferos. Em mamíferos, uma das proteínas responsivas ao vírus e reguladas por IFN é codificada pelo gene Arf-GAP com dois domínios plaquistrinos 2 (ADAP2, também conhecido como CENTA2 e Centaurina- β). A caracterização molecular e biológica da proteína ADAP2 de galinha (chADAP2) foi realizada neste estudo. Análises de bioinformática foram realizadas para identificar características da sequência de aminoácidos desta proteína e compará-las com as sequências obtidas de mamíferos. A expressão do gene chADAP2 foi calculada após a infecção em células de galinha (DF-1) com o vírus da influenza aviária (AIV) de dois subtipos (H2N1 e H5N1) em diferentes tempos. A localização da proteína chADAP2 e sua interação com a proteína MAVS de galinha (chMAVS) e grânulos de estresse (G3BP1) em células de galinhas foi acessada pela microscopia confocal e pela co-imunoprecipitação. A atividade antiviral foi avaliada após a transfecção de plasmídeos expressando as proteínas de chADAP2 em células infectadas com o subtipo H9N2 do AIV. Nossos resultados mostraram que as sequências de aminoácidos da proteína ADAP2 deram origem a dois clusters (mamíferos e aves) na análise filogenética. Após a infecção com os isolados AIV houve um aumento de expressão do gene chADAP2, entre o período de 0 a 48 horas em células aviárias. A co-localização entre as proteínas chADAP2, MAVS e grânulos de estresse (G3BP1) na região citoplasmática celular foi confirmada

pela microscopia confocal. A interação entre chADAP2 e chMAVS foi também comprovada pela co-immunoprecipitação. Finalmente, a atividade antiviral foi confirmada pela diminuição de infecção de AIV em células transfectadas com o plasmídeo expressando a proteína chADAP2 em células de galinha. O presente estudo identificou que a proteína chADAP2 possui um papel semelhante ao descrito pela ADAP2 em células de mamíferos, apesar da distância genética das sequências de nucleotídeos e organização dos domínios proteicos entre eles. Nossos dados confirmam a interação entre os grânulos de estresse e as proteínas da resposta antiviral, com as proteínas chADAP2 e chMAVS envolvidas na cascata para expressão de IFN tipo I. Este é o primeiro relato sobre o papel chADAP2 em células aviárias. Este novo conhecimento sobre a resposta imune inata permitirá o desenvolvimento de ferramentas para o controle de infecções virais em aves.

Palavras-chave: ADAP2. MAVS. sistema imune de galinhas. imunidade inata. Grânulos de estresse. Interferon. Antiviral. Vírus.

ABSTRACT

SCAGION, G. P. **ArfGAP with dual pleckstrin domains 2 protein in the chicken innate immune system**. 2020. 163p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Avian and mammals have some similarities in their innate immune system, but they also show differences due to their evolutionary divergence. A few components of the interferon (IFN) pathway are absent in chicken cells, such as the RIG-I gene, IRF 3, and IRF 9. Other components are unique in their innate immune response, like the toll-like receptor 15 (TLR15) gene. The type I IFN pathway, activates the IFN-stimulated genes (ISGs), which plays a crucial role against viruses by establishing an antiviral state in the host. However, molecular mechanisms of this induction in avian are poorly understood and can be evolutionarily distinct from mammalian. In mammalian, one of the virus-responsive and IFN-regulated protein is encoded by Arf-GAP with dual PH Domain-Containing Protein 2 gene (ADAP2, also known as CENTA2 and Centaurin- β). Molecular and biological characterization of chicken ADAP2 protein (chADAP2) was performed in this study. Bioinformatics analyses were performed to identify molecular features in the amino acid sequence and compare them to sequences obtained from mammals. chADAP2 gene expression was calculated after infection in chicken cells (DF-1) with avian influenza viruses (AIV) from two subtypes (H2N1 and H5N1) at different time points. The co-localization of chADAP2 protein with the chicken MAVS (chMAVS) and stress granules (G3BP1) in chicken cells was evaluated by confocal microscopy and co-immunoprecipitation. The antiviral activity was evaluated after the transfection of plasmids expressing chADAP2 protein in cells infected with AIV from H9N2 subtype. Our results showed that the ADAP2 amino acid sequences had two clusters (mammals and avian) by phylogenetic analysis. After infection with AIV isolates, an upregulation of the ADAP2 gene was detected from 0 to 48 hours in chicken cells. Confocal microscopy assays confirmed the co-localization of chADAP2, MAVS, and G3BP1 proteins in the cells' cytoplasmic region. The interaction between chADAP2 and chMAVS has been also proven by co-

immunoprecipitation. Finally, the antiviral activity of the chADAP2 was confirmed by a decrease in AIV expression in cells transfected with the plasmid expressing the chADAP2 protein in chicken cells. The present study identified that chADAP2 has a similar role, as described in mammals' cells, despite their high genetic distances of nucleotide sequences and protein domains organization. Our results confirm the interaction among stress granules and antiviral response proteins, such as ADAP2 and chMAVS proteins involved in the cascade for IFN type I. This is the first report of the chADAP2 role in avian cells. This new knowledge about the innate immune response will allow the development of tools for controlling virus infections in birds.

Keywords: ADAP2. MAVS. chicken immune system. innate immunity. Stress granules. Interferon. Antiviral. Virus.