

CINTHIA DE LIMA ARAUJO

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

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Armando Morais Ventura

Versão original

São Paulo
2018

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Vírus Respiratório Sincicial Humano

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

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

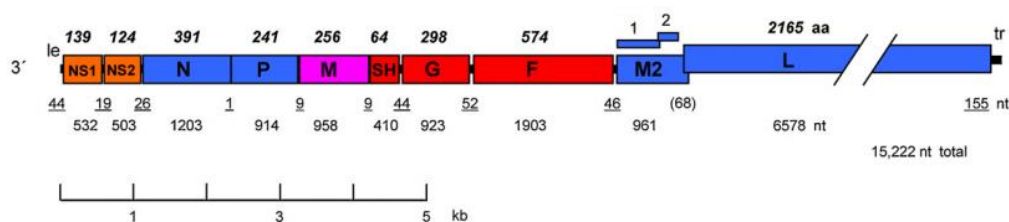
O hRSV induz a infecção aguda do trato respiratório inferior com uma variedade de manifestações tais como bronquiolite e pneumonia, que são acompanhadas por sintomas como tosse, chiado e desconforto respiratório (CANEDO-MARROQUIN et al., 2017).

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

1.2 Estrutura e genoma viral

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

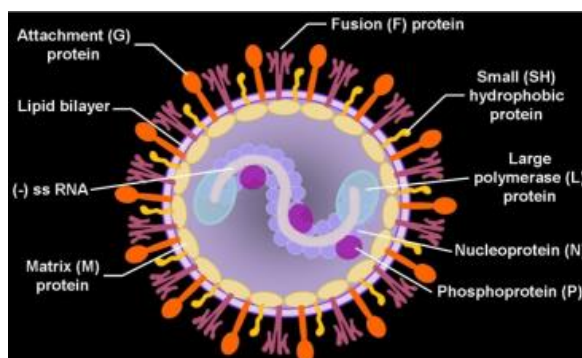
Figura 1. Mapa do genoma do hRSV, cepa A2.



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

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

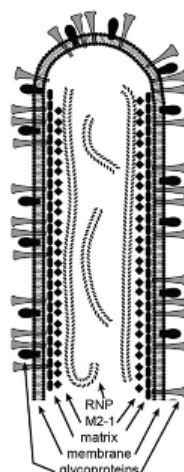
Figura 2. Esquema da estrutura da partícula viral do hRSV.



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

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

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



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

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

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

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

Durante a replicação do hRSV é possível observar no citoplasma das células

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

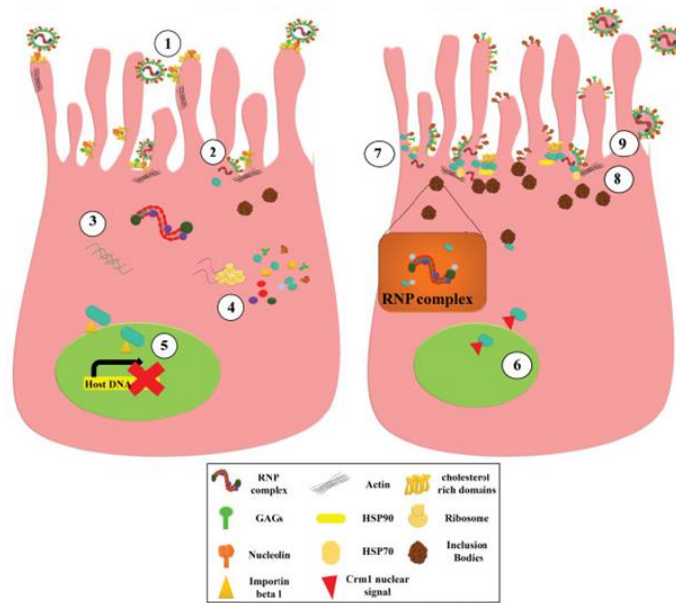
1.3 Infecção e ciclo replicativo

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

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

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

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



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

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

1.4 Epidemiologia

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

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

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

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

1.5 Dados anteriores do laboratório

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

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

1.6 As principais proteínas celulares e virais abordadas nesse estudo

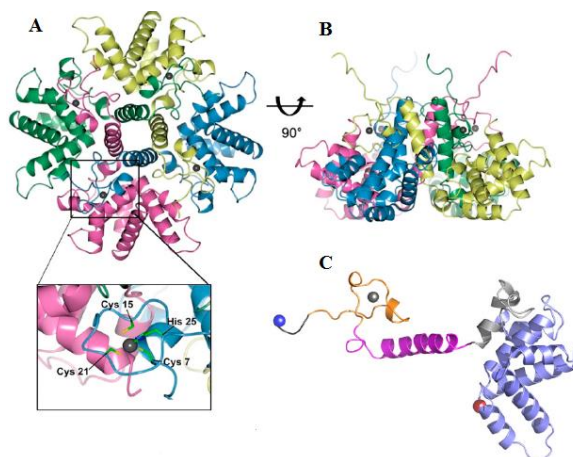
Ao considerar que as proteínas virais M2-1, N e P estão presentes nos *IB's*, onde ocorrem os processos de transcrição e replicação do vírus, pode-se afirmar que estas proteínas possuem um importante papel para a compreensão do ciclo viral e das possíveis interações proteína-proteína que ocorrem nessas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

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

1.6.1A proteína M2-1

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

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



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

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

Através de experimentos com mini-replicons, foi identificado que a região correspondente ao *zinc-binding domain* (resíduos 7 até 25, também reconhecido como *Cys₃-His₁motif*) é essencial para a função da proteína, e consequentemente para a infectividade do vírus. Além disso, através de análise de mutantes com deleções, ficou reconhecido que a região N-terminal é importante para o dobramento da proteína (MELERO, 2007).

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

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

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

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

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

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

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

1.6.2 A nucleoproteína N

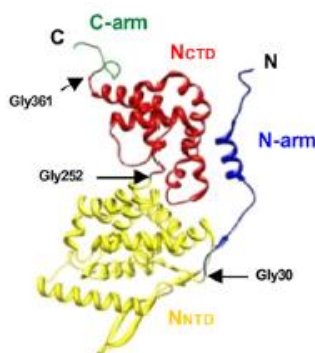
A proteína N possui 391 aminoácidos e sua estrutura foi resolvida através de expressão em bactéria, tendo sido caracterizada como arranjo em anel decamérico associado com o RNA bacteriano, assumindo-se que este anel possivelmente imita uma volta da hélice do RNP helicoidal (TAWAR et al., 2009). Os domínios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

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

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

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

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



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

1.6.3 A fosfoproteína P

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

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

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

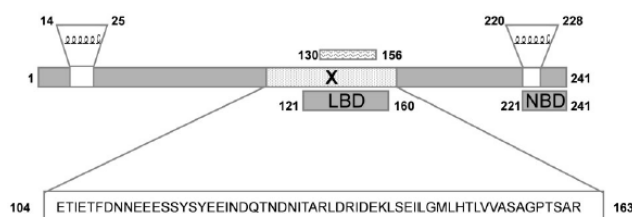
A proteína P também atua como uma chaperona, prevenindo a interação da N recém-sintetizada com o RNA celular durante o processo de formação de novas partículas virais nas

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

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

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

Figura 7. Representação da estrutura primária da proteína P.



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

1.6.4 Proteínas YBX1 e YBX3

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

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

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

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

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

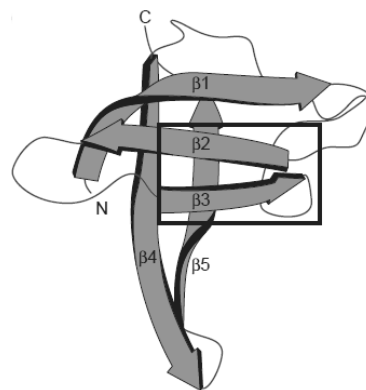


Diagrama da estrutura molecular do CSD de *Bacillus subtilis*. As folhas beta estão numeradas em ordem a partir do N terminal. O retângulo preto indica a superfície de ligação ao DNA. Fonte: MATSUMOTO; WOLFEE, 1998.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.6.5As poly-A binding proteins

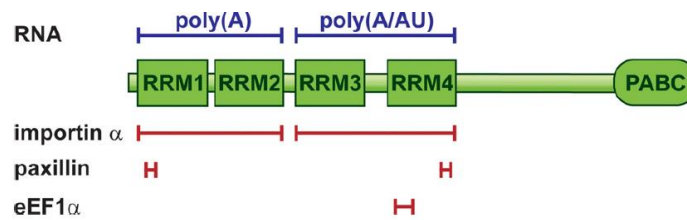
A família das *poly(A)-binding proteins* (PABP's) apresenta uma distribuição predominantemente citoplasmática difusa mas essas proteínas também podem estar concentradas em locais onde ocorre a tradução (SMITH et al., 2014). As PABP's se ligam com alta especificidade à cauda poli-A e ficam complexadas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

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

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

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

Figura 9. Os domínios das PABP's.



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

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

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

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

6 CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados permitem as seguintes conclusões:

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DURFEE, T. et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhouse. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 7, p. 2597-2606, 2008.

CANE, P. Molecular Epidemiology and Evolution of HRSV. In: CANE P (Edit.). Perspectives in Medical Virology: **Respiratory Syncytial Virus**. Elsevier, p. 89-113, 2007.

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

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

COLLINS, P. L.; MINK, M. A.; STEC, D. S. Rescue of synthetic analogs of respiratory syncytial

virus genomic RNA and effect of truncations and mutations on the expression of a foreign reporter gene. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, n. 21, p. 9663-9667, 1991.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

GUDERIAN, G. et al. RioK1, a New Interactor of Protein Arginine Methyltransferase 5 (PRMT5), Competes With pICln for Binding and Modulates PRMT5 Complex Composition and Substrates

Specificity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 3, p. 1976-1986, 2011.

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

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

JACKSON, S. E. Hsp90: Structure and Function in Molecular Chaperones. **Molecular Chaperones**, p. 155-240, 2012.

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

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

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

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

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

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

LU, Z. H.; BOOKS, J. T.; LEY, T. J. Cold Shock Domain Family Members YB-1 and MSY4 Share Essential Functions during Murine Embryogenesis. **Mol Cell Biol**, v. 26, p. 8410- 8417, 2006.

LYABIN, D. N.; ELISEEVA, I. A.; OVCHINNIKOV, L. P. YB-1 Protein: Functions and Regulation. Willey Interdisciplinary. **WIREs RNA**, v. 5, p. 95–110, 2014.

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

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

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

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

MCDONALD, T. P. et al. Evidence that the Respiratory Syncytial Virus Polymerase Complex Associates with Lipid Rafts in Virus-infected Cells: a Proteomic Analysis. **Virology**, v. 330, p. 147-157, 2004.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SCHERER, W. F.; SYVERTON, J. T.; GEY, G. O. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 97, p. 695-710, 1953.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1580-1585, 2014.

TAWAR, R. G. et al. Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. **Science**, v. 326, p. 1279–1283, 2009.

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

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

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

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