

ANA BEATRIZ RUIZ AFONSO BARBOSA

Caracterização da interação entre a Nucleofosmina e a proteína de Matriz do Vírus Sincicial Respiratório Humano e suas implicações na replicação viral

Versão Simplificada

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

São Paulo
2022

RESUMO

BARBOSA, Ana Beatriz Ruiz Afonso. **Caracterização da interação entre a nucleofosmina e a proteína de matriz do Vírus Sincicial Respiratório Humano e suas implicações na replicação viral.** 2022. 114 folhas. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) está entre os patógenos mais importantes do trato respiratório. Esse vírus causa doença respiratória principalmente em recém-nascidos, bebês, crianças, idosos e pacientes imunocomprometidos. Até o presente não há antiviral eficiente ou vacina aprovada. O genoma do hRSV codifica 11 proteínas, sendo elas de extrema importância para o entendimento da relação vírus-hospedeiro. Em trabalhos anteriores do laboratório foram analisadas 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 de infecção. Verificou-se que N interage com as proteínas celulares Hsp70, PRMT5 e WDR77; P interage com Hsp70 e com Tropomiosina; e M com Nucleofosmina (NPM1) e Tropomiosina. Neste projeto temos por objetivo caracterizar a interação da proteína de Matriz do hRSV com NPM1, além de buscar possíveis implicações funcionais para a replicação do vírus. A proteína de M tem sido implicada com a montagem e brotamento da partícula viral, além da inibição da transcrição do genoma viral e de genes celulares. No início da infecção, a proteína M localiza-se no núcleo da célula hospedeira, onde postulávamos ocorrer a interação com a NPM1, proteína originalmente nucleolar, multifuncional, com capacidade de transitar entre o nucléolo, núcleo e citoplasma. Assim, propusemos confirmar tal interação e analisar, em diferentes fases da replicação viral, a distribuição intracelular de ambas as proteínas. Fizemos ensaios funcionais, avaliando a replicação do vírus após inibição de NPM1, e observamos a ação de um inibidor da oligomerização de NPM1 na replicação viral. Os resultados mostraram que a NPM1 não mudou sua redistribuição em células infectadas pelo hRSV, permanecendo nucleolar e nucleoplasmática, assim como em células não infectadas, além de não observarmos pontos de co-localização entre M e NPM1 por imunofluorescência confocal. O mesmo foi visto ao transfectarmos vetor de expressão para a proteína M. Em estudos de fracionamento celular de células infectadas, observamos indícios de um aumento de NPM1 para o nucleoplasma e para a cromatina em células infectadas. No entanto, em fracionamento de células expressando apenas M, não observamos o mesmo padrão. A partir de um shRNA direcionado contra mRNA de NPM1, foi possível observar a diminuição da expressão de fosfoproteína P em células infectadas, mesmo padrão observado ao tratar as células com um inibidor da oligomerização da NPM1 (NSC348884). Tratamento com este inibidor também teve a capacidade de prejudicar a síntese global de proteínas virais. Tais resultados sugerem que a NPM1 interfira no ciclo replicativo do hRSV.

Palavras-chave: Vírus sincicial respiratório humano, hRSV, Interação vírus-célula, Nucleofosmina, NPM1, Proteína de Matriz, M.

ABSTRACT

BARBOSA, A. B. R. A. **Characterization of the interaction between nucleophosmin and the Human Respiratory Syncytial Virus matrix protein and its implications for viral replication.** 2022. 114 folhas. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Human Respiratory Syncytial Virus (hRSV) is among the most important pathogens of the respiratory tract. This virus causes respiratory disease mainly in newborns, infants, children, the elderly and immunocompromised patients. To date, there is no effective antiviral or approved vaccine. The hRSV genome encodes 11 proteins, which are extremely important for understanding the virus-host relationship. Previous work in the laboratory analyzed the interactions of the viral proteins Nucleoprotein (N), Phosphoprotein (P) and Matrix (M) with cellular proteins, both by the individual expression of these viral proteins transfecting plasmid vectors, and in the context of infection. N was found to interact with cellular proteins Hsp70, PRMT5 and WDR77; P interacts with Hsp70 and with Tropomyosin; and M with Nucleophosmin (NPM1) and Tropomyosin. In this project we aimed to characterize the interaction of the hRSV Matrix protein with NPM1 and to seek its possible functional implications for the virus replication. The M protein has been implicated in the assembly and budding of the viral particle, and to the inhibition of transcription of the viral genome and cellular genes. At the beginning of the infection, the M protein is located in the nucleus of the host cell, where we postulated the interaction with NPM1, an originally nucleolar, multifunctional protein, with the ability to transit between the nucleolus, nucleus and cytoplasm. Thus, we proposed to confirm this interaction and analyze, at different stages of viral replication, the intracellular distribution of both proteins. We performed functional assays, evaluating virus replication after NPM1 inhibition, and observed the action of an NPM1 oligomerization inhibitor on viral replication. The results showed that NPM1 did not change its redistribution in hRSV-infected cells, remaining nucleolar and nucleoplasmic, as well as in uninfected cells, and we did not observe points of colocalization between M and NPM1 by confocal immunofluorescence. The same was seen when we transfected an expression vector for the M protein. In cell fractionation studies of infected cells, we observed evidence of an increase in NPM1 for the nucleoplasm and chromatin in infected cells. However, in fractionating cells expressing M alone, we did not observe the same pattern for NPM1. By using an shRNA directed against NPM1 mRNA, it was possible to observe a decrease in phosphoprotein P expression in infected cells, the same pattern observed when treating cells with an NPM1 oligomerization inhibitor (NSC348884). Treatment with this inhibitor also had the ability to impair the overall synthesis of viral proteins. These results suggest that NPM1 interfere in the replicative cycle of hRSV.

Keywords: Human respiratory syncytial virus, hRSV, Virus-cell interaction, Nucleophosmin, NPM1, Matrix protein, M.