TÁBATA DILENARDI DIAS

INTERAÇÃO ENTRE TROPOMIOSINA E AS PROTEÍNAS DE MATRIZ E
FOSFOPROTEÍNA 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
2017

RESUMO

DIAS, T. D. **Interação entre tropomiosina e as proteínas de matriz e fosfoproteína do Vírus Respiratório Sincicial Humano**. 2017. 68 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) é um dos patógenos mais importantes do trato respiratório, causando doença respiratória principalmente em recém-nascidos e bebês. O genoma do HRSV codifica onze proteínas, sendo fundamental para entender a sua relação com o hospedeiro, caracterizar as interações entre essas proteínas e os componentes celulares. Em trabalhos anteriores do laboratório foram analisadas por co-imunoprecipitação, as interações das proteínas virais fosfoproteína (P) e matriz (M) com proteínas celulares, tanto pela expressão individual dessas proteínas virais transfectando vetores plasmidiais, quanto no contexto da infecção. Foi verificado que P interage com Hsp70 e com tropomiosina (TPM); e M com nucleofosmina e TPM. Dados da literatura mostram que a infecção por HRSV exerce forte interferência sobre a localização intracelular de actina, fenômeno que propomos estar relacionado à interação de TPM com M e P, levando ao rearranjo dos microtúbulos. Devido a possibilidade dessas proteínas terem um papel relevante na replicação viral foi feito um trabalho de aprofundamento na análise dessas interações neste projeto. O gene da TPM identificado na co-imunoprecipitação (isoforma 3, TPM 3) foi otimizado para expressão em bactérias, bem como, em trabalho anterior, os genes de M e P. Para essas proteínas foram adquiridos ou produzidos anticorpos e vetores de expressão, possibilitando propor os objetivos de analisar interações em bactéria, *in vitro* e em células. Com a abordagem em bactéria não evidenciamos interação de TPM 3 com M ou P. Já para a abordagem *in vitro* os dados obtidos indicam que ocorre interação entre M e TPM 3, mas não entre P e TPM 3. Os estudos realizados em células, utilizando microscopias de imunofluorescência e confocal, mostraram que o vírus modifica o padrão de localização de TPM 3. Nesses estudos também foram obtidos dados que indicam a co-localização de M e P com TPM 3 em filamentos de brotamento viral e corpúsculos de inclusão citoplasmáticos. Além disso, foi testado se a inibição da expressão de TPM 3 por siRNA ou sua super-expressão por transfecção, afetariam a replicação do vírus. Os dados obtidos com siRNA indicaram que não houve efeito. Já para a super-expressão de TPM 3 verificamos que ocorre inibição da replicação viral. Finalmente, testamos uma droga que desacopla TPM 3 dos filamentos de actina e obtivemos resultados que indicam inibição da replicação viral. Concluímos com esses dados que TPM 3 tem papel funcional no ciclo replicativo do vírus e que suas interações com M e P têm potencial para ser exploradas como alvos terapêuticos no desenvolvimento de antivirais contra HRSV.

Palavras-chave: Vírus Respiratório Sincicial Humano. Tropomiosina. Matriz. Fosfoproteína. Interação célula-vírus

ABSTRACT

DIAS, T. D. **Interaction between tropomyosin and the Human Respiratory Syncytial Virus proteins matrix and phosphoprotein.** 2017. 68 f. Dissertation (Master in Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) is one of the most important pathogens of the respiratory tract and causes respiratory disease in newborns and babies. The HRSV genome encodes eleven proteins, and it is essential to understand its relationship with the host, to characterize the interactions between these proteins and cellular components. In previous co-immunoprecipitation studies, interactions of the viral proteins phosphoprotein (P) and matrix (M) with cellular proteins, were analyzed both by individual expression of these viral proteins or in infected cells. It was found that P interacts with Hsp70 and with tropomyosin (TPM) and M with nucleophosmin and tropomyosin. The data from the literature show that HRSV infection exerts strong interference on intracellular location of actin, a phenomenon that we propose to be connected to the interaction of TPM with M and P, leading to the rearrangement of microtubules. The TPM gene identified in co-immunoprecipitation (isoform 3, TPM 3) was optimized for expression in bacteria. Also in previous work, the M and P proteins were expressed in bacteria. For these proteins antibodies and expression vectors have been acquired or produced, making it possible to propose in this project to analyze the reported interactions in more detail in bacteria, in vitro and in cells. The data obtained indicate that in bacteria we don't see TPM 3 interaction with M or P. For the in vitro interaction assays the results show interaction between M and TPM 3, but not between P and TPM 3. The studies in cells, using immunofluorescence and confocal microscopy, show that the virus changes TPM 3 localization pattern. Also, co localization between M, P and TPM 3 was shown in budding virus filaments and cytoplasmic inclusion bodies. In cells we also tested if TPM 3 expression inhibition by siRNA or its overexpression by transfection, would affect virus replication. For the siRNA experiments no effect was observed. For the TPM 3 overexpression, however, an inhibitory effect on virus replication was seen. Finally, we tested a drug that uncouples TPM 3 from F-actin and found that it inhibits HRSV replication. These data indicate that TPM 3 plays a key role in the virus replication cycle and therefore its interactions with M and P have the potential to be exploited as therapeutic targets in the development of antiviral drugs against HRSV.

Keywords: Human respiratory syncytial virus. Tropomyosin. Matrix. Phosphoprotein. Virus-cell interaction.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características Gerais

O Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) foi isolado em humanos em 1957 (CHANOCK et al., 1957). Encontra-se dentro da ordem *Mononegavirales*, família *Pneumoviridae*, gênero *Orthopneumovirus*, segundo as normas do *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) (BUKREYEV et al., 2016). O HRSV esquematizado à figura 1 é um vírus envelopado cujo genoma consiste em uma fita simples de RNA não segmentada e com polaridade negativa.

Figura 1 - Esquema da partícula viral do HRSV.

Fonte: Produção própria; Dias, 2017.

O genoma esquematizado à figura 2 contém 15.222 nucleotídeos (cepa A2) e 10 genes que codificam 11 proteínas: NS1 e NS2 (não estruturais), N (nucleoproteína), 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 - Proteínas e genoma do HRSV.

Esquema do genoma indicando em cima o tamanho das proteínas acima (aa) e dos genes abaixo (nt). Fonte: (COLLINS; MELERO, 2011).

F, G e SH são glicoproteínas transmembrânicas do envelope (PRETEL et al., 2013). A proteína G é responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira (BOHMWALD et al., 2016) enquanto que a F medeia a penetração viral bem como a fusão entre células infectadas e seus vizinhos (COLLINS; MELERO, 2011). A proteína SH pertencente à família de proteínas virais pequenas altamente hidrofóbicas que são capazes de formar canais iônicos em membranas celulares (GAN et al., 2008), outra característica descrita para a SH é um efeito anti-apoptótico que promove a replicação viral (FUENTES et al., 2007).

Na superfície interna da membrana está a proteína de matriz M que desempenha um papel fundamental na montagem de partículas de vírus. Os papéis de M no processo de montagem viral incluem uma função de reunir o complexo ribonucleoprotéico (RNP) e o envelope viral (MITRA et al., 2012a).

O complexo ribonucleoprotéico (RNP), ou nucleocapsídeo, é um complexo formado pela molécula de RNA associada com as proteínas N, P, L e M2-1 que juntos regulam a transcrição e replicação do RNA viral. A nucleoproteína (N) é a mais abundante, interage fortemente com o RNA e tem a função de o proteger de clivagem por componentes do hospedeiro (COLLINS et al., 2001). Outra proteína que constitui o nucleocapsídeo é a fosfoproteína (P) que é um co-fator essencial da polimerase, a proteína “*large*” (L) que contém o sítio ativo de polimerização, sendo que P age como uma espécie de fator de transcrição (STEC et al., 1991). A L é a proteína viral menos expressa de todas nas células hospedeiras infectadas, e os papéis principais desta proteína são a replicação e a transcrição do genoma viral, regulados e suportados pelo complexo RNP (GROSFELD et al., 1995). A proteína M2-1 como parte do complexo RNP também está envolvida no processo de transcrição e atua como um fator de anti-terminação que promove a transcrição dos genes do HRSV, ajudando a proteína L a prosseguir com a transcrição de genes virais (BOHMWALD et al., 2016).

As proteínas NS1 e NS2 não estão presentes no vírion maduro e ambas tem a capacidade de interferir com o sistema do hospedeiro na produção de interferons (BOHMWALD et al., 2016; COLLINS; MELERO, 2011).

1.2 Ciclo replicativo

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 que interage com proteoglicanos de heparan sulfato e glicosaminoglicanos condroitina sulfato B (GAG) (LAMBERT et al., 1988). Em seguida, a proteína F entra em contato com seu receptor nucleolina (TAYYARI et al., 2011) e media a fusão das membranas viral e celular, permitindo a liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma.

O processo de transcrição mediado pela proteína L ocorre principalmente em corpúsculos de inclusão citoplasmáticos, sugerindo uma intensa replicação e transcrição viral nessas estruturas, os mRNAs são transcritos pela RNA polimerase dependente de RNA do vírus, usando como molde o RNA de polaridade negativa do genoma (COLLINS et al., 2001). A proteína L associada com a proteína P é capaz de reconhecer a região promotora 3' do RNA viral e iniciar a transcrição dos genes virais (COWTON et al., 2006). Ao final a polimerase L reconhece um sinal de terminação do gene na extremidade 5' do mRNA e realiza a poliadenilação (KUO et al., 1996).

Alternativamente à transcrição, ocorre a replicação do genoma com a produção de uma molécula de polaridade positiva com a extensão total do genoma, o antígenoma, que serve de molde para a transcrição de novos genomas. Essas novas cadeias de RNA são imediatamente encapsuladas pela proteína N (COWTON et al., 2006).

A montagem do vírus, após transcrição e replicação do RNA viral, depende da localização da proteína M e ocorre em domínios ricos em colesterol (BOHMWALD et al., 2016). Em seguida a proteína M une o RNP ao envelope viral. A proteína M se associa com o complexo ribonucleoproteico através da proteína M2-1, e se liga à parte interna do envelope através da cauda citoplasmática da proteína G para fazer a montagem do vírus (MITRA et al., 2012). A figura 3 mostra um esquema do ciclo de replicação do HRSV.

Figura 3 - Ciclo de replicação do HRSV.

Fonte: Dr. JF Éleouët não publicado, modificado.

1.3 Patogênese e Epidemiologia

O HRSV é o agente patogênico mais importante causador de doença respiratória severa em recém-nascidos, bebês e crianças, além de pacientes imunocomprometidos e idosos (FALSEY, WALSH, 2000). A sintomatologia da doença durante a infecção primária pelo HRSV pode variar muito, como manifestações clínicas típicas de um resfriado comum, incluindo congestão nasal, tosse, falta de ar, febre bronquite e pneumonia (COLLINS, GRAHAM, 2008).

As infecções pelo HRSV têm distribuição mundial e ocorrem anualmente, estima-se que ocorra uma incidência anual de aproximadamente 34 milhões de casos de infecção respiratória inferior aguda associada com infecção por HRSV em crianças menores de 5 anos. Pouco mais de 3 milhões de episódios resultam em hospitalização e entre 66.000 e 199.000 episódios resultaram em morte (NOLAN et al., 2015).

O HRSV é altamente contagioso e 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). 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

maior diferença entre os grupos A e B se dá na proteína G (COLLINS; MELERO, 2011). Anualmente pode haver co-circulação de diferentes genótipos dos grupos A e B na mesma comunidade. Essas diferenças entre genótipos podem contribuir para a ocorrência de reinfecções (MOREIRA, 2015).

1.4 Tratamento e Prevenção

Devido ao impacto socioeconômico mundial do HRSV, torna-se fundamental seu estudo visando à prevenção da infecção. Mesmo com os grandes avanços na área, ainda não existe vacina aprovada contra o HRSV pois o seu desenvolvimento tem sido dificultado por vários fatores como a alta taxa de reinfecção (RAMEIX-WELTI et al., 2014).

Pesquisas mais recentes tem avançado nos estudos com imunização em camundongos a partir de vacinas de partículas semelhantes a vírus VLPs (*virus like particles*) contendo híbridos de F ou G, demonstrando que a imunização com essas vacinas proporciona proteção completa e confere uma ação reforçada contra uma infecção HRSV (CAI et al., 2017; CIMICA et al., 2016). Porém ainda não existem previsões de testes clínicos e da liberação dessas vacinas comercialmente.

A forma de tratamento mais efetiva na infecção pelo HRSV é o uso de um anticorpo monoclonal humanizado contra a proteína F, o Palivizumab (SynagisTM; MedImmune), que é um neutralizador do vírus pois inibe a entrada do vírus na célula. Esse produto não impede necessariamente a infecção por HRSV, mas pode restringir a replicação o suficiente para reduzir a doença (COLLINS; MELERO, 2011). 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). A ribavirina, que foi a primeira droga licenciada para o tratamento da infecção por HRSV em humanos, é um análogo de nucleosídeo que interfere com a replicação tanto de vírus com genoma de RNA como de DNA, no entanto, o seu uso na clínica é agora muito limitado pois sua eficácia é controversa e não é recomendada para uso rotineiro por sua alta toxicidade (COLLINS; MELERO, 2011).

1.5 Dados anteriores do laboratório

No laboratório o HRSV é o modelo de estudo para responder perguntas visando contribuir para o entendimento da interação vírus-célula, o que pode levar à caracterização de novos alvos terapêuticos. A clonagem dos genes virais para a expressão em células eucariotas foi o ponto de partida para essas abordagens experimentais. Em trabalhos iniciais as tentativas de expressar os genes de HRSV em células de mamíferos foram frustrantes. Dados da

literatura indicaram 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 baixo *codon adaptation index* (TERNETE et al., 2007).

A partir disso encomendou-se a síntese dos genes de N, P e M com a sequência nucleotídica otimizada para a expressão eficiente em células de mamífero, estes foram subclonados 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 utilizando anticorpo anti-FLAG, seguida de espectrometria de massas. Foram selecionadas as proteínas identificadas que tiveram maior porcentagem de cobertura, para análises 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. A segunda abordagem foi imunoprecipitar extratos de células infectadas pelo vírus 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 (isoforma 3); e M com as proteínas Nucleofosmina e Tropomiosina (OLIVEIRA et al., 2013).

Outra abordagem foi clonar esses genes em vetores para expressão bacteriana, o que permite o estudo das interações entre proteínas purificadas *in vitro*. Dos dados de espectrometria de massas das imunoprecipitações das proteínas celulares interagentes mencionadas acima, foram obtidos os números de acesso do Uniprot (SIMABUCO, 2009; TAMURA, 2009). De posse das sequências de aminoácidos, foram encomendados genes sintéticos com *codon usage* otimizado para expressão em bactérias. Esses genes foram subclonados nos vetores de expressão bacteriana pET28a (Novagen) e pGex-4T-3 (GE Healthcare), em que os peptídeos têm adicionados cauda His ou GST ao amino terminal, respectivamente. A expressão das construções em pGex foi testada e em todas foi possível ver a expressão dos peptídeos (Oliveira, Eleouet, Fix, Galloux e Ventura, dados não publicados). As interações *in vitro* recentemente abordadas em outros trabalhos no laboratório foram de Hsp70 com N e P (OLIVEIRA, 2013), e do metilossomo com N (OGAWA, 2016), sendo que ambas revelaram potenciais alvos terapêuticos testados com inibidores tanto da

Hsp70 (MUNDAY et al., 2015), como da metil-transferase presente no mitossomo (OGAWA, 2016).

1.6 Hipótese de trabalho

Das interações identificadas no laboratório, mencionadas acima (OLIVEIRA et al., 2013), exploramos neste trabalho as interações entre tropomiosina (TPM) e M ou P. O conjunto de dados da literatura mencionado a seguir, indica que essas interações podem ser importantes para o HRSV.

A despolimerização de F-actina afeta a multiplicação de HRSV, indicando que ela tem papel fundamental na replicação, montagem e brotamento desse vírus (BURKE et al., 1998; KALLEWARD et al., 2005). Em células infectadas, por outro lado, ocorre um rearranjo de F-actina indicando que no processo de infecção o vírus manipula esse polímero (JEFFREE et al., 2007).

Um dado importante que associa a interação entre M e P com TPM (OLIVEIRA et al., 2013) e F-actina, é que na ausência de TPM a F-actina torna-se alvo de cofilina sendo cortada em fragmentos menores (ONO; ONO, 2002). Assim, a hipótese que pode ser formulada é de que a alteração dos microfilamentos celulares provocada pelo HRSV é, ao menos em parte, devida à interferência de M e P na interação entre TPM e actina, possibilitando a ação da cofilina e levando ao relaxamento ou reorientação da organização do citoesqueleto.

1.7 Proteínas virais e celulares abordadas neste estudo

Finalmente, comentamos a seguir em mais detalhes as proteínas abordadas neste estudo.

1.7.1 Proteína de Matriz

A proteína de matriz (M) do HRSV faz parte da estrutura interna do virion, alinhando-se à superfície interna do envelope viral, e sendo menor que as M presentes nos demais membros da família *Paramyxoviridae*, e apresenta um domínio hidrofóbico no C-terminal que pode mediar interação com a membrana (COLLINS et al., 2001). A proteína M está relacionada com a maturação dos filamentos virais e é importante para a organização dos componentes do virion na membrana plasmática e para o tráfico de proteínas virais para o local de brotamento sendo essencial para a montagem das partículas virais na replicação do HRSV (MITRA et al., 2012). M também pode silenciar a síntese de RNA viral em preparação para o empacotamento da partícula viral (COLLINS; MELERO, 2011; FIELDS, 2001). Alguns estudos mostram que a proteína M interage com a proteína M2-1, como um meio para interagir com o complexo

RNP, além de interagir com as proteínas G e F para sinalizar a montagem dos virions (BOHMWALD et al., 2016).

A proteína M em solução e em cristais forma dímeros sugerindo que sua unidade de montagem biologicamente relevante é dimérica (Figura 4). A dimerização e oligomerização adequadas de M são críticas para o brotamento viral, estudos com mutações de M na interface de dimerização demonstram uma interrupção na formação de filamentos semelhantes a vírus na superfície de células transfectadas, abolindo a liberação de VLPs (FÖRSTER et al., 2015).

Figura 4 - Dímero da proteína de matriz .

Representação estrutural da proteína de matriz dimérica baseado em dados de cristalografia com o PDB 4V23 (FÖRSTER et al., 2015).

1.7.2 Fosfoproteína

A fosfoproteína (P) composta por 241 aminoácidos é mais curta do que as suas homólogas dentre os paramyxovirus, e é chamada de fosfoproteína por ser fosforilada nas serinas das posições 116, 117, 119, 232 e 237 (NAVARRO et al., 1991). P interage com a proteína N impedindo que N de auto-agregue ou se ligue a RNAs não virais 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). Além disso, P se liga às proteínas L e M2-1 e ajuda a mediar suas interações com o nucleocapsídeo. P também é um cofator essencial da polimerase, contribuindo para alterações conformacionais que ajudam a polimerase a acessar o molde de RNA e liberar o promotor e o alongamento da cadeia pela polimerase viral (FIELDS, 2001).

A proteína P forma um homo-tetrâmero onde observam-se módulos estruturados e não estruturados (KARLIN et al., 2003). A estrutura da região dos aminoácidos 104 a 161 da proteína P do HRSV foi caracterizada mostrando que contém alfa-hélices (Figura 5), além de ser o domínio responsável pela sua oligomerização (LLORENTE et al., 2008).

Figura 5 - Tetrâmero da fosfoproteína.

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).

1.7.3 Tropomiosina

A tropomiosina (TPM) pertence à família de ligantes de actina e desempenha um papel fundamental na regulação dos filamentos de actina nas células musculares e não musculares (GUNNING; O'NEILL; HARDEMAN, 2008). A tropomiosina forma um dímero de alfa-hélices com estrutura *coiled-coil* (Figura 6), associando-se ao longo dos filamentos de actina e proporcionando estabilidade, modulando e organizando os microfilamentos do citoesqueleto (LIN et al., 2008).

Em mamíferos há quatro genes que codificam para TPM: α , β , γ e δ , também referidos como TPM1, TPM2, TPM3 e TPM4, respectivamente. O processamento alternativo dos transcritos destes quatro genes, o uso de múltiplos promotores e a escolha do local de poliadenilação levam à expressão de pelo menos 22 isoformas de TPM diferentes em seres humanos (WANG; COLUCCIO, 2010).

Figura 6 - Dímero de Tropomiosina.

Está apresentada representação da interação entre duas moléculas de tropomiosina baseado em dados de cristalografia. Fonte: Brown et al. (2005).

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nesta dissertação permitem as seguintes conclusões:

- Em estudo de interação entre M ou P e TPM 3 co-expressas em bactéria, foi observado que não há interação entre essas proteínas virais e TPM 3.
- Em estudo de interação entre M ou P e TPM 3 *in vitro*, foi observado que há interação entre as proteínas M e TPM 3, e que não há interação entre a proteína P e TPM 3.
- Em estudos do nível de expressão de TPM 3 é possível perceber aumento no nível de sua expressão em células infectadas por HRSV.
- Em estudos de localização intracelular de TPM 3 foi observada modificação de sua distribuição na presença do vírus.
- Em estudos de co-localização por imunofluorescência entre M ou P e TPM 3, sendo M expressa por transfecção ou por infecção e P somente por infecção, foi possível observar a co-localização dessas proteínas, com TPM 3 presente nos filamentos de brotamento viral e nos corpúsculos de inclusão citoplasmáticos.
- Em estudos de inibição de TPM 3 por siRNA foi observado que não houve efeito sobre a replicação viral.
- Em estudos de super-expressão de TPM 3 foi observado que houve efeito de inibição da síntese das proteínas virais M e G, além da inibição da formação de filamentos de brotamento viral.
- Em estudos de inibição de TPM 3 com a droga TR100 foi observado que houve efeito de inibição da síntese das proteínas virais M, P e N.

REFERÊNCIAS*

- ANDERSON, L. J. et al. Anti-genic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. **Journal of Infectious Disease**, v. 151, p. 626–659, 1985.
- AUSUBEL, F.M. et al. **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: John Wiley & Sons; 1994.
- BOHMWALD, K. et al. Human Respiratory Syncytial Virus: Infection and Pathology. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 37, n. 4, p. 522–537, 2016.
- BOLLAG, D. M.; ROZYCKI, M. D.; EDELSTEIN, S. J.; **Protein methods**. 2nd ed. New York: Wiley-liss; 1996.
- BONELLO, T. T. et al. A small molecule inhibitor of tropomyosin dissociates actin binding from tropomyosin-directed regulation of actin dynamics. **Scientific Reports**, v. 6, n. August 2015, p. 19816, 2016.
- BROWN, J.H. et al. Structure of the mid-region of tropomyosin: Bending and binding sites for actin. **Proceedings National Academy of Science**. v. 102, n. 52, p. 18878-18883, 2005.
- BUKREYEV, A. et al. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. **Virology Division News**, p. 2351–2360, 2016.
- BURKE, E. et al. Role of cellular actin in the gene expression and morphogenesis of human respiratory syncytial virus. **Virology**, v. 252, n. 1, p. 137–48, 1998.
- BURKE, E. et al. Profilin Is Required for Optimal Actin-Dependent Transcription of Respiratory Syncytial Virus Genome RNA. **Journal of Virology**, v. 74, n. 2, p. 669–675, 2000.
- CAI, M. et al. Virus-like particle vaccine by intranasal vaccination elicits protective immunity against respiratory syncytial viral infection in mice. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 49, n. December 2016, p. 74–82, 2017.
- CARROMEU C. et al. Intracellular localization of human respiratory syncytial virus L protein. **Archives of Virology**, v. 152, n. 12, p. 2259-2263, 2007
- 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. **American Journal of Hygiene**, v. 66, n. 3, p. 281-90, 1957.
- CHOI, H.S. et al. Tropomyosin3 overexpression and a potential link to epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma. **BMC Cancer**, v. Apr 1, n. 10, p. 122, 2010.
- CIMICA, V. et al. Novel respiratory syncytial virus-like particle vaccine composed of the postfusion and prefusion conformations of the F glycoprotein. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 23, n. 6, p. 451–459, 2016.

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

COLLINS, P. L.; CHANOCK, R. M.; MURPHY, B. R. Respiratory Syncytial Virus. In: **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 2001.

COLLINS, P. L.; GRAHAM, B. S. Viral and host factors in human respiratory syncytial viruspathogenesis. **Journal of Virology**, v. 82, n. 5, p. 2040-55, 2008.

COLLINS, P. L.; MELERO, J. A. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: Still crazy after all these years. **Virus Research**, v. 162, n. 1–2, p. 80–99, 2011.

CURRAN, J.; MARQ, J. B.; 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. **Journal of Virology**, v. 69, p. 849-855, 1995.

COWTON, V.M.; MCGIVERN, D.R.; FEARNES R. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 7, p. 1805–1821, 2006.

DE JESUS, B.L.S. **Transcriptoma do vírus sincicial respiratório humano em células Hep-2**. 2016. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

DURIGON, E.L. et al. Vírus sincicial humano: revisão e levantamento dos dados brasileiros. São Paulo: Divisão Hospitalar dos Laboratórios. **ABBOTT**; 1999.

FALSEY, A. R.; WALSH, E. E. Respiratory syncytial virus infection in adults. **Clin Microbiological Reviews**, v. 13, n. 3, p. 371-84, 2000.

FIELDS, B. N., KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M., & GRIFFIN, D. E. **Fields virology**. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

FÖRSTER, A. et al. Dimerization of matrix protein is required for budding of respiratory syncytial virus. **Journal of virology**, v. 89, n. 8, p. 4624–35, 2015.

FUENTES, S. et al.. Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. **Journal of Virology**, v. 81, n. 15, p. 8361–8366, 2007.

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

GAN, S.W. et al. Structure and ion channel activity of the human respiratory syncytial virus (hRSV) small hydrophobic protein transmembrane domain. **Protein Science**, v. 17, n.5, p. 813–820, 2008.

GARCÍA, J. et al. Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. **Virology**, v. 195, p. 243-247, 1993.

GLEZEN, W. P. et al. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. **American journal of diseases of children**, v. 140, n. 6, p. 543–6, 1986;.

GROSFELD, H.; HILL, M.G.; COLLINS, P.L. RNA replication by respiratory syncytial virus (RSV) is directed by the N, P, and L proteins; transcription also occurs under these conditions but requires RSV superinfection for efficient synthesis of full-length mRNA. **Journal of Virology**, v. 69, n. 9, p. 5677–5686, 1995.

GUNNING, P.; O'NEILL, G.; HARDEMAN, E. Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. **Physiological Reviews**, p. 1–35, 2008.

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

JEFFREE, C. E. et al. Ultrastructural analysis of the interaction between F-actin and respiratory syncytial virus during virus assembly. **Virology**, v. 369, p. 309–323, 2007.

KALLEWAARD, N. L.; BOWEN, A. L.; CROWE, J. E. Cooperativity of actin and microtubule elements during replication of respiratory syncytial virus. **Virology**, v. 331, p. 73–81, 2005.

KARLIN, D. et al. Structural disorder and modular organization in Paramyxovirinae N and P. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 12, p. 3239–52, 2003.

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. Jul., p. JVI.00256-14, 2014.

KUO, L.; FEARN, R.; COLLINS PL. The structurally diverse intergenic regions of respiratory syncytial virus do not modulate sequential transcription by a dicistronic minigenome. **Journal of Virology**, v. 70. n. 9, p. 6143–6150, 1996.

LAMBERT D.M. Role of oligosaccharides in the structure and function of respiratory syncytial virus glycoproteins. **Virology**, v. 164, n. 2, p. 458–466, 1988.

LI, D. et al. Association of Respiratory Syncytial Virus M Protein with Viral Nucleocapsids Is Mediated by the M2-1 Protein. **Journal of Virology**, v. 82, n. 17, p. 8863–8870, 2008.

LIN, J. J. C. et al. Human tropomyosin isoforms in the regulation of cytoskeleton functions. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 644, p. 201–222, 2008.

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: Structure, Function and Genetics**, v. 72, n. 3, p. 946–958, 2008.

MASON, S. W. et al. Interaction between Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) M2-1 and P Proteins Is Required for Reconstitution of M2-1-Dependent RSV Minigenome Activity. **Journal of Virology**, v. 77, n. 19, p. 10670–10676, 2003.

MESHRAM, C. D. et al. The Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein, Matrix Protein, and Fusion Protein Carboxy-Terminal Domain Drive Efficient Filamentous Virus-Like Particle Formation. **Journal of Virology**, v. 90, n. September, p. JVI.01193-16, 2016.

MITRA, R. et al. The Human Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Is Required for Maturation of Viral Filaments. **Journal of Virology**, v. 86, p. 4432–4443, 2012.

MOREIRA, F. B. **Infecções por Vírus Sincicial Respiratório (VSR) no período de dois anos: Epidemiologia molecular e impacto clínico.** 2015. Dissertação (Mestre em microbiologia, parasitologia e patologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

MUFSON, M. A. et al. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. **Journal of General Virology**, v. 66, n. Pt 10, p. 2111–24, 1985.

MUNDAY, D. C. et al. Interactome Analysis of the Human Respiratory Syncytial Virus RNA Polymerase Complex Identifies Protein Chaperones as Important Cofactors That Promote L-Protein Stability and RNA Synthesis. **Journal of Virology**, v. 89, n. 2, p. 917–930, 2015.

NAVARRO, J.; LOPEZ-OTIN, C.; VILLANUEVA, N. Location of phosphorylated residues in human respiratory syncytial virus phosphoprotein. **Journal of General Virology**, v. 72, n. Pt 6, p. 1455–59, 1991.

NOLAN, T. et al. Prevalence and incidence of respiratory syncytial virus and other respiratory viral infections in children aged 6 months to 10 years with influenza-like illness enrolled in a randomized trial. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 11, p. e80–e89, 2015.

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

OGAWA, J. K. **Caracterização da interação entre o metilossomo e o nucleocapsídeo do vírus respiratório sincicial humano.** 2016. 86 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

OLIVEIRA, A. P. **Caracterização da nucleoproteína e fosfoproteína do Vírus Respiratório Sincicial Humano quanto suas propriedades imunogênicas e de interação com proteínas celulares.** 2013. 161p. Tese (Doutorado em Microbiologia) - 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, p. 108–112, 2013.

ONO, S.; ONO, K. Tropomyosin inhibits ADF/cofilin-dependent actin filament dynamics. **Journal of Cell Biology**, v. 156, p. 1065–76, 2002.

PRETEL, E.; CAMPOREALE, G.; DE 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, p. 1–9, 2013.

RAMEIX-WELTI, M. A. et al. Visualizing the replication of respiratory syncytial virus in cells and in living mice. **Nature Communications**, v. 5, p. 5104, 2014.

RIBEIRO, P. G. G. **Caracterização funcional e antigênica da proteína de matriz do Vírus Respiratório Sincicial humano**. 66 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

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

SIDWELL, R. W.; BARNARD, D. L. Respiratory syncytial virus infections: recent prospects for control. **Antiviral Research**, v. 71, n. 2-3, p. 379-90, 2006.

SIMABUCO, F. M. et al. Production of polyclonal antibodies against the human respiratory syncytial virus nucleoprotein and phosphoprotein expressed in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 53, n. 1, p. 209-15, 2007.

SIMABUCO, F. M., et al. 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 Virology, Methods**. v. 158, p. 93–99, 2009.

SPEHNER, D.; DRILLIEN, R.; HOWLEY, P. M. The assembly of the measles virus nucleoprotein into nucleocapsid-like particles is modulated by the phosphoprotein. **Virology**, v. 9, n. 232(2), p. 260-8, 1997.

STEC, D. S.; HILL, M. G.; COLLINS, P. L. Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. **Virology**, v. 183, p. 273-287, 1991.

STEHN, J. R. et al. A novel class of anticancer compounds targets the actin cytoskeleton in tumor cells. **Cancer Research**, v. 73, n. 16, p. 5169–5182, 2013.

TAMURA R. E. **Estudo dos domínios Funcionais da proteína de matriz do Virus Respiratório Sincicial Humano**. 2009. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TAYYARI, F. et al. Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. **Nature Medicine**, v. 17, n. 9, p. 1132–1135, 2011.

TERNETTE, N. et al. Expression of RNA virus proteins by RNA polymerase II dependent expression plasmids is hindered at multiple steps. **Virology**, v. Jun 5, p. 4-51, 2007.

WANG, C. L.; COLUCCIO, L. M. New insights into the regulation of the actin cytoskeleton by tropomyosin. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 281, n. 10, p. 91–128, 2010.