Estudo dos domínios Funcionais da proteína de matriz do Virus Respiratório Sincicial Humano

Rodrigo Esaki Tamura

Tese (doutorado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantã/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Armando Morais Ventura

São Paulo

2009

RESUMO

Tamura RE, Estudo dos domínios funcionais da proteína de matriz do Virus Respiratório Sincicial Humano [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2009.

A proteína de matriz do Virus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) tem sido implicada com a montagem e brotamento da partícula viral, além de inibição da transcrição da célula hospedeira. Essa proteína foi o foco deste trabalho. Em um primeiro momento os objetivos consistiam no estudo dos domínios funcionais da proteína e de sua avaliação como imunógeno vacinal. No entanto, houve grande dificuldade na expressão dessa proteína fora do contexto do ciclo replicativo viral, com o gene sob controle de promotor dependente da RNA polimerase II. Verificamos que o gene de matriz possui sítios internos de poliadenilação, sinais de instabilidade de RNA, baixo índice de adaptação de codons (CAI) e conteúdo GC, que podem impedir a expressão gênica. Para solucionar esse problema foi utilizado um gene sintético com a sequência do gene de matriz otimizada, que apresentou altos níveis de expressão em células transfectadas quando comparado ao gene selvagem. Esse alto nível de expressão permitiu a confirmação da presença da proteína M no núcleo das células no início de sua expressão, além de sua associação a membranas em regiões conhecidas como *lipid rafts*. Também foram feitos ensaios de imunoprecipitação e análise por espectrometria de massa, em células transfectadas que mostraram a capacidade da proteína M de interagir com tropomiosina, o que pode ter relevância na estabilidade da F-actina e na formação dos filamentos de estruturas virais, necessários para a montagem da partícula viral. Além disso, foram analisados os possíveis domínios funcionais para localização nuclear e associação a membranas através de expressão de variantes da proteína M com deleções de trechos da sua sequência peptídica. Por fim, ainda foram analisadas as capacidades de indução de resposta imune contra as proteínas de fusão, glicoproteína e M de HRSV usando os respectivos genes sob controle do promotor de CMVie na forma de vetores plasmidiais ou adenovirais.

Palavras-chave: Vírus Respiratório Sincicial Human. Matriz. Otimização gênica. *Lipid rafts*. Tropomiosina. Domínios funcionais. Localização intracelular.

ABSTRACT

Tamura RE, Study of the Human Respiratory Syncytial Virus matrix protein functional domains [PhD Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

The Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) matrix (M) protein has been implicated with viral particle assembly, budding and inhibition of host cell transcription. Our objectives were to study HRSV M protein functional domains and its evaluation as a vaccinal immunogen. The expression of this protein was difficult to achieve out of the viral replication cycle context, when its gene was cloned under control of an RNAPol II dependent promoter. We found that M gene has internal polyadenilation sites, RNA instability motifs, low codon adaptation index (CAI) and GC content, that may impair its expression. To overcome this problem a synthetic optimized matrix gene was obtained and was highly expressed when compared to the wild-type M gene in transfected cells. This high level of expression made possible to show that M has a nuclear localization in the beginning of its expression, and its association with membranes in regions known as lipid rafts. Immunoprecipitation and Mass Spectrometry analysis were conducted in transfected cells and indicated that the matrix protein associates with tropomyosin, which may be relevant to the F-actin stability and the formation of the structural viral filaments, needed for the assembly of the viral particles. We further analyzed the possible functional domains responsible for nuclear localization and membrane association, through expression of M protein deletion mutants. Finally, the immune response against HRSV fusion, glycoprotein and M proteins was evaluated with their genes under control of ieCMV promoter in plasmid or adenoviral vectors.

Key words: Human Respiratory Syncytial Virus. Matrix. Gene optimization. Lipid rafts. Tropomyosin. Functional domains. Intracellular localization.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico e classificação

O vírus respiratório sincicial foi descrito pela primeira vez em 1956. Sendo inicialmente isolado de chimpanzés e recebendo assim a nomenclatura de CCA (*Chimpanzee Coryza Agent*) (Morris, Blount e Savage, 1956). Mais tarde um vírus idêntico ao CCA foi encontrado em uma criança com pneumonia e em outra com crupe, esse vírus apresentava como característica a capacidade de formar sincícios em culturas de células (Chanock e Finberg, 1957a). Estudos epidemiológicos da época já apontavam para a alta prevalência do vírus em crianças, indicando por testes sorológicos que a maioria das crianças de Baltimore tiveram contato com o vírus até os quatro anos de idade (Chanock e Finber, 1957b). O nome foi substituído por HRSV (*Human Respiratory Syncytial Virus*), devido a sua capacidade de formar sincícios em culturas de células e pela sua predileção pelo trato respiratório. No Brasil em 1967 foi realizado o primeiro relato do isolamento do vírus estudando-se 24 crianças com quadro respiratório no ano de 1964 (Candeias, 1967).

O HRSV é classificado como um membro do gênero *Pneumovirus* da família *Paramyxoviridae*, ordem *Mononegavirales*.

1.2 Epidemiologia e vacinas

O HRSV é a principal causa de doença do trato respiratório inferior, especialmente bronquiolite e pneumonia, sendo o responsável por um grande número de internações hospitalares de crianças até cinco anos de idade (Clarke, *et al.*, 1978). Em prematuros, imunocomprometidos ou com defeitos congênitos pode produzir lesões crônicas, atingindo uma letalidade de até 35% em pacientes com doença cardíaca ou com displasia pulmonar (Hall, *et al.*, 1986).

Estudo com crianças internadas em dois hospitais públicos do Rio de Janeiro, por problemas respiratórios entre os anos de 1997-98 indicou a presença de HRSV em 47,1% dos casos (D'Elia, *et al.*, 2005). Enquanto no Reino Unido, cerca de 20.000 crianças são internadas anualmente devido à infecção por HRSV (Handforth, Friedland e Sharland, 2000).

O pico de severidade da infecção por HRSV é entre 2-6 meses de idade, portanto a vacinação deveria se iniciar nos primeiros meses de vida. Uma das dificuldades encontradas para o desenvolvimento de vacinas é a imaturidade do sistema imune no primeiro ano de vida, em especial nos 6 primeiros meses (Crowe, 1999).

Utilizando-se vírus inativado com formalina na década de 60 foi realizada a primeira tentativa de produção de uma vacina anti-HRSV. Os resultados, no entanto, foram insatisfatórios, sendo observada maior severidade da doença nas crianças vacinadas (Kim, *et al.*, 1969). Desde então novos esforços tem sido realizados, incluindo peptídeos sintéticos (Bastien *et al.*, 1997), antígenos virais recombinantes (Oien, *et al.*, 1994), vacinas de DNA (Li, *et al.*, 1998), vírus vaccinia recombinante deficiente em replicação (Wyatt, *et al.*, 1999), Vesicular Stomatitis vírus recombinante (Kahn, *et al.*, 1999) e HRSV atenuado (Murphy e Collins, 2002). No entanto, ainda não há nenhuma vacina aprovada para o uso em humanos (CDC- *Centers for Disease Controls and Prevention*).

1.3 Genoma e estrutura da partícula viral

O ciclo replicativo do HRSV é citoplasmático, sendo que os virions adquirem um envelope lipídico a partir da membrana plasmática. Apresenta genoma de RNA fita simples polaridade negativa, cuja transcrição é dirigida por sinais em cis e produz RNAm subgenômicos. O genoma da cepa protótipo A2 tem 15,222 kb, de onde são transcritos 10 RNAm subgenômicos. Quatro desses mRNAs codificam proteínas do nucleocapsídeo: N (proteína de nucleocapsídeo), P (fosfoproteína), L (RNA polimerase RNA-dependente), M2-1 (fator de elongação). Três codificam glicoproteínas transmembrânicas do envelope: F (proteína de fusão), G (glicoproteína) e SH (proteína hidrofóbica pequena). Há ainda duas proteínas não estruturais (NS1 e NS2) e a proteína M (matriz, interna ao envelope) (Collins, *et al.*, 2001). Na Figura 1 estão apresentados um esquema e uma micrografia eletrônica do HRSV.

Figura 1. À esquerda - esquema da partícula de HRSV.

Fonte: Universidade de Warwick, Pneumovirus Laboratory, UK.

À direita - micrografia eletrônica do HRSV

Fonte: Dartmouth Medical School – <http://www.epidemic.org/theFacts/viruses/images>.

1.4 Proteínas virais

1.4.1 Proteína F

A proteína de fusão dirige a penetração viral por fusão entre o envelope do virion e a membrana plasmática da célula hospedeira. F expressa na superfície celular pode mediar fusão entre células vizinhas para formar sincícios. É formada como um precursor F_0 , que é clivado por proteases celulares no complexo de Golgi, fornecendo um heterodímero F_1 - F_2 ligado por pontes dissulfeto (Collins, Huang e Wertz, 1984). HRSV recombinante, sem as proteínas G e SH, ainda apresenta capacidade de infectar células e de formar sincícios, assim F é capaz de mediar fusão independentemente das demais glicoproteínas (Techaarpornkul, Barretto e Peebles, 2002).

1.4.2 Proteína SH

A proteína SH (*small hydrophobic*- proteína hidrofóbica pequena) é uma proteína de membrana pequena, ancorada por uma sequência hidrofóbica, com a porção C-terminal orientada para o meio extracelular (Collins e Mottet, 1993). A sua função permanece desconhecida, sendo que sua ausência não tem efeito na eficiência de formação e propagação de partículas virais. A formação de sincícios, no entanto, é mais eficiente quando as proteínas G, F e SH estão presentes, indicando que SH pode ter sua função ligada às demais glicoproteínas (Heminway, *et al.*, 1994).

1.4.3 Proteína G

A glicoproteína G foi identificada como a principal proteína de reconhecimento do receptor, pois anticorpos dirigidos contra ela bloqueiam a ligação do virion a células HeLa, enquanto anticorpos contra F previnem a fusão, mas não a ligação (Levine, Klaiber-Franco e Paradiso, 1987). A proteína G apresenta uma única região hidrofóbica próxima a extremidade N-terminal, que serve tanto como peptídeo sinal, como para ancorar a membrana (Hendricks, McIntosh, Patterson, 1988), e não é essencial para a montagem e propagação viral *in vivo* ou *in vitro*, no entanto sua presença estimula o crescimento viral (Karron, *et al.*, 1997). Estudo visando a caracterização de receptores em células de mamíferos, que possam ser alvo na infecção por HRSV, indicou que a anexina II é capaz de ligar com a proteína G (Malhotra, *et al.*, 2003).

1.4.4 Proteína N

O nucleocapsídeo é formado pelas proteínas de nucleocapsídeo (N), fosfoproteína (P), RNA polimerase RNA-dependente (L) e pelo RNA genômico. A proteína N de HRSV é menor que suas contrapartes na família *Paramyxoviridae*, sendo composta por 391 aminoácidos. Liga-se intimamente a RNA genômico e antígenômico para formar nucleocapsídeos resistentes a RNase (Collins, *et al.*, 2001).

1.4.5 Proteína P

A proteína P apresenta 241 aminoácidos e também é menor que suas contrapartes na família *Paramyxoviridae* (Collins, *et al.*, 2001). Para o vírus Sendai aparentemente funciona como uma chaperonina para a forma solúvel de N (Curran, Marq e Kolakofsky, 1995). A proteína P não fosforilada produzida em sistema bacteriano, quando fornecida para a realização de ensaios de transcrição *in vitro* mediado pelo nucleocapsídeo, acabou gerando produtos de RNA aberrantes, de modo que a fosforilação da proteína P é necessária para a estabilização do complexo de replicação (Dupuy, *et al.*, 1999).

1.4.6 Proteína L

A proteína L contém seis segmentos discretos, que contêm resíduos altamente conservados e provavelmente representam os domínios funcionais da polimerase (Stec, Hill e Collins, 1991). Na porção central da proteína L há um possível domínio de interação com o RNA, com capacidade de *capping* de RNAm (Liuzzi, Mason e Cartier, 2005).

1.4.7 Proteína M2-1

A proteína M2-1 é um fator de anti-terminação na replicação do RNA genômico, sendo essencial para a viabilidade viral (Fearnly e Collins, 1999). Apresenta um *zinc-finger* próximo a extremidade amino-terminal que é indispensável para a sua função (Hardy e Wertz, 2000).

1.4.8 Proteínas não estruturais

As proteínas não estruturais (NS1 e NS2) são detectadas apenas em traços nas preparações de virions purificados e, portanto, são consideradas não estruturais. Demonstrou-se que NS1 co-precipita com M (Evans, Cane e Pringle, 1996), enquanto NS2 co-localiza-se com N nas células (Weber, *et al.*, 1995). Foi verificado que a expressão de NS1 é altamente inibitória para transcrição e replicação de RNA viral (Atreya, Peeples e Collins, 1998). NS2 apresenta também capacidade inibitória, porém, mais baixa. Mutantes sem os genes NS1 ou NS2 apresentam crescimento atenuado tanto *in vitro* como *in vivo* (Teng e Collins, 1998).

1.4.9 Proteína de matriz

A proteína de matriz faz parte da estrutura interna do virion e é menor que suas contrapartes na família *Paramyxoviridae*. Apresenta um domínio hidrofóbico no C-terminal, que pode mediar interação com a membrana (Collins, *et al.*, 2001).

Muito do que se sabe da proteína de matriz de HRSV é por correlação com a proteína M de outros membros da família *Paramyxoviridae*. Numa cepa de vírus Sendai com uma mutação que confere termosensibilidade à proteína M, verificou-se a interrupção da produção de partículas

virais em incubação a 38 °C, porém sem afetar a expressão gênica. A produção viral é restaurada, no entanto, quando a proteína M é fornecida em *trans*, sugerindo que M tem importância na montagem da partícula viral (Kondo, *et al.*, 1993).

Utilizando vetores de expressão com os genes de matriz e nucleoproteína do vírus Parainfluenza, ao transfectar células de mamíferos, verificou-se que expressa sozinha a proteína M é capaz de liberar vesículas e que em conjunto com a nucleoproteína pode liberar vesículas contendo estruturas similares a nucleocapsídeos (Coronel, *et al.*, 1999). Em trabalho posterior, constatou-se que a incorporação do nucleocapsídeo à partícula viral é mediada por interações específicas com a proteína M, sendo a região C-terminal (domínio II) de N a responsável pela interação tanto com P, quanto com M (Coronel, *et al.*, 2001).

Ghildyal e colaboradores verificaram que um extrato de ribonucleoproteínas virais, de células infectadas por HRSV, apresenta capacidade aumentada de transcrição *in vitro* na presença de anticorpos monoclonais contra a proteína M. Isso se dá de forma dose dependente, o que sugere que a proteína M apresenta atividade inibitória da transcrição (Ghildyal, *et al.*, 2002). Posteriormente esse mesmo grupo verificou que no início da infecção a proteína M de HRSV localiza-se no núcleo. Além disso, o extrato nuclear de células infectadas por HRSV possui capacidade de inibir transcrição *in vitro* mediada por um promotor eucariótico. A presença da proteína M no núcleo durante o início da infecção sugere que essa proteína poderia não só inibir a transcrição viral antes do encapsidamento, mas que poderia também inibir a expressão de genes celulares, possivelmente para facilitar a replicação viral (Ghildyal, *et al.*, 2003). A região entre os aminoácidos 110-183 da proteína M fusionada ao gene EGFP foi suficiente para a localização nuclear e a importação dessa proteína é mediada pela importina β 1, sendo sua retenção e acúmulo nuclear mediados por um possível domínio *zinc-finger* (Ghildyal, *et al.*, 2005a).

A interação da proteína M com os corpos de inclusão, formados essencialmente pelo genoma viral e as proteínas N, P, L e M2-1, é mediada pela interação da sua extremidade N-terminal com a proteína M2-1 (Li, *et al.*, 2008).

Para o vírus Sendai, verificou-se que a interação entre M e as glicoproteínas virais ocorre no percurso secretório, de forma que M é necessária para a associação dessas glicoproteínas com a membrana (Sanderson, McQueen e Nayak, 1993). Outro estudo com o vírus Sendai indicou que M dirige-se à membranas internas após interação com o nucleocapsídeo (Stricker, Mottet e Roux, 1994). Trabalhando com vetores plasmidiais expressando as proteínas M e F, Takimoto e

colaboradores (Takimoto, *et al.*, 2001) verificaram que essas proteínas individualmente são capazes de provocar a liberação de vesículas, porém em conjunto a taxa de liberação dessas vesículas é aumentada em 4 vezes.

Diferentemente do que ocorre com o vírus Sendai, verificou-se que em HRSV a proteína de matriz dirige-se para a membrana plasmática das células por mecanismo independente das glicoproteínas. M é então acumulada em estruturas da membrana resistentes a detergentes, conhecidas como *lipid rafts*, de modo que esse tipo de interação é estabilizada pela presença da glicoproteína F (Henderson, Murray e Yeo, 2002). Outros pesquisadores também verificaram que a proteína de matriz de HRSV está presente no lado citoplasmático da membrana plasmática em associação a *lipid rafts*, assim como as proteínas G e N. Assim estas estruturas poderiam ser os locais de montagem e brotamento da partícula viral (Marty, *et al.*, 2004).

A interação entre a proteína de matriz e a proteína G foi postulada por Reena Ghildyal e colaboradores (Ghildyal, *et al.*, 2005b), após demonstração de co-localização das duas proteínas íntegras por imunofluorescência. Variantes da proteína G sem o domínio citoplasmático e sem um terço do domínio transmembrana não apresentaram tal co-localização. Essa interação ocorre de forma que a região N-terminal localizada entre os resíduos 2-6 (com serina na posição 2 e aspartato na posição 6) da proteína G desempenha papel fundamental.

A capacidade de interação da proteína M de HRSV da cepa *Long* com o RNA foi analisada e chegou-se a conclusão de que os resíduos em contato com o RNA estavam localizados entre os aminoácidos 120 e 170. As lisinas nas posições 121, 130, 156 e 157 e a arginina na posição 170 são essenciais para essa interação com o RNA. Além disso, verificou-se que a expressão da proteína não era capaz de afetar a replicação e transcrição de análogos de RNA de HRSV *in vivo* (Rodriguez, *et al.*, 2004).

Utilizando-se alinhamento de sequência protéica, derivações de árvore filogenética, perfil hidropático e predições de estrutura secundária de proteínas de matriz de vírus de fita simples negativos, não foi possível verificar estruturas primárias, secundárias ou terciárias conservadas. O perfil hidropático, no entanto, indica que essas proteínas são associadas à membrana. A sequência da proteína M de HRSV está mais relacionada com o RSV bovino e TRTV, sugerindo uma relação evolucionária. No N-terminal há uma região hidrofílica, enquanto próximo ao C-terminal há uma região altamente hidrofóbica. As proteínas de matriz de HRSV e Ebola apresentam em suas extremidades N-terminal uma similaridade na estrutura secundária, sendo esta região da

proteína de matriz do vírus Ebola necessária para a oligomerização e a formação dos diferentes estados conformacionais. Além disso, as regiões mais provavelmente relacionadas com a interação com a membrana são três hélices preditas entre os resíduos 43-53, 173-191 e 210-216 (Latiff, *et al.*, 2004).

1.5 Silenciamento de promotor de CMVie

Um estudo visando aumentar a eficiência de expressão de vetores baseados em promotores de CMVie mostrou que diferentes métodos de transfecção apresentam eficiência de expressão de genes repórteres de no máximo 20%. Para aumentar a eficiência da expressão desses vetores os autores adicionaram 5'-azacitidina, uma droga que causa desmetilação de ilhas CpGs, o que levou a aumento na eficiência de expressão de mais de 80% em macrófagos (Escher, *et al.*, 2004).

Outros autores também atestaram a capacidade de inibição de expressão de transgenes pelo silenciamento do promotor de CMVie devido a presença de ilhas CpGs. Brooks e colaboradores verificaram que vetores adenovirais de primeira geração em ensaios *in vivo* apresentavam um pico de expressão em 6 horas e em 24 horas a expressão do transgene diminuía 56 vezes e em 72 horas a diminuição era de 240 vezes, enquanto o número de cópias de RNAm caía 385 vezes nesse período, de forma que foi observado metilação do vetor nas células musculares tanto em sítios CpGs, quanto em outros sítios (Brooks, *et al.*, 2004).

A linearização dos plasmídeos super-enrolados repletos de ilhas CpGs resulta em expressão sustentada de transgenes. Dados mostram que em ensaios *in vivo* há uma redução de 95% da expressão do transgene um dia após a injeção do vetor com o promotor natural de CMVie repleto de ilhas CpGs. Ilhas CpGs metiladas recrutariam as proteínas de ligação a CpGs metilados (MBD1, MBD2, MeCP2) e histonas deacetilases, que iriam mediar a repressão transcricional do transgene. A linearização ou o uso de promotores de CMVie otimizados sem ilhas CpGs levaram a um aumento e prolongamento da expressão de genes sob o controle de promotores de CMVie (Hodges, *et al.*, 2004).

1.6 Expressão e otimização dos genes de HRSV

Em geral para a expressão das proteínas de HRSV, os pesquisadores utilizam vetores contendo os genes virais sob influencia de um promotor de T7 e infecção com um vírus vaccinia, que expresse a T7 RNA polimerase, que leva a transcrição dos genes no citoplasma da célula, em situação semelhante à replicação viral (Grosfeld, Hill e Collins, 1995).

Para ensaios de imunização com vacinas de DNA, os autores geralmente trabalham com epitopos ou com as proteínas inteiras de F (Li, *et al.* 1998; Martinez, *et al.*, 1999; Bembridge, *et al.*, 2000, Tree, *et al.*, 2004; Harcourt, *et al.*, 2004; Taylor, *et al.*, 2005), ou G (Li, *et al.*, 2000; Bembridge, *et al.*, 2000; Miller, *et al.*, 2002; Harcourt, *et al.*, 2003). Em todos os casos além de utilizarem um promotor eucariotico forte como o de CMV ou SV40, ainda adicionam uma sequência intronica, como o Intron A. Ainda assim esses autores falham em demonstrar a expressão dos genes por transfecção.

As proteínas virais de HRSV e VSV (cujas transcrição e replicação ocorrem no citoplasma), apresentam pouca ou nenhuma expressão quando seus genes estão dependentes da RNA polimerase II. Isso ocorre porque esses genes muitas vezes possuem em sua sequência motivos de instabilidade de RNA, baixo conteúdo GC, sinais de poliadenilação e CAI (*codon adaptation index*) baixo. Para a proteína de fusão de HRSV o elemento mais importante para a deficiência de expressão foi a presença de sinais de poliadenilação, mas a otimização dos codons aumenta em muito a expressão do gene F sob controle de um promotor de CMVie. Esses autores adquiriram o gene modificado da empresa Geneart, que otimizou a sequência gênica dos genes F de HRSV e G de VSV para o *codon usage* humano e removeram as sequências de instabilidade e sinais de poliadenilação (Ternette, *et al.*, 2007a). Dando continuidade a esse trabalho, esse mesmo grupo mostrou que vetores plasmidiais contendo o gene F otimizado de HRSV A2 ou um ectodominio dessa proteína sob controle de um promotor de CMVie, produzem uma indução de resposta imune muito superior à de vetores plasmidiais contendo o gene selvagem. Os ensaios de desafio indicaram para o gene otimizado e em especial o ectodominio redução da carga viral da ordem de 13-170 vezes (Ternette, *et al.*, 2007b).

Em outro trabalho de 2007, os autores trabalharam com genes otimizados também pela Geneart, nesse caso utilizaram os genes de fusão e nucleocapsideo do BRSV. Realizaram ensaios de imunização utilizando esses genes sintéticos Fsyn e Nsyn sob controle de um promotor de

CMVie e verificaram que houve uma fraca resposta humoral, mas uma alta resposta celular mediada por esses vetores de DNA, que levaram inclusive a proteção contra o BRSV (Boxus, *et al.*, 2007).

6 CONCLUSÕES

- A proteína M não pode ser expressa, utilizando o gene M selvagem, em sistema eucariótico baseado na expressão nuclear, devido a sinais de poliadenilação, baixo conteúdo GC e de CAI e sinais de instabilidade de RNA, presentes na sequência nucleotídica.
- A otimização do gene de matriz para o *codon usage* humano permite a expressão da proteína M, tanto em sistemas de expressão eucarióticos dependentes da RNA polimerase II, quanto em sistemas bacterianos.
- A proteína M expressa fora do contexto da infecção viral, conserva a propriedade de se localizar no núcleo no início da sua expressão e mais tardiamente de se associar a membranas.
- Os dados obtidos indicam que o domínio de localização nuclear pode estar compreendido entre os resíduos 4-52 da proteína M.
- Os dados obtidos corroboram as evidências de que a capacidade de associação de M com a membrana citoplasmática é essencial para digirir o complexo de replicação viral à membrana, em especial em regiões de *lipid rafts*.
- Os dados obtidos indicam que o domínio responsável pela associação à membrana citoplasmática pode estar na região de alfa-hélice compreendida entre os resíduos 43-53 (na porção N-terminal).
- O gene M otimizado, expresso a partir do vetor pShuttle, foi capaz de induzir resposta imune humoral quando associado ao adjuvante fosfato de alumínio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- Atreya PL, Peeples ME, Collins PL. The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication. *J Virol* 1998 Feb; 72(2):1452-61.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, Albright LM, Coen DM, Varki A, Janssen K. *Current protocols in molecular biology*. USA: John Wiley & Sons; 1994
- Bastien N, Taylor G, Thomas LH, Wyld SG, Simard C, Trudel M. Immunization with a peptide derived from the G glycoprotein of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) reduces the incidence of BRSV-associated pneumonia in the natural host. *Vaccine*. 1997 Aug-Sep; 15(12-13):1385-90.
- Bembridge GP, Rodriguez N, Garcia-Beato R, Nicolson C, Melero JA, Taylor G. DNA encoding the attachment (G) or fusion (F) protein of respiratory syncytial virus induces protection in the absence of pulmonary inflammation. *J Gen Virol*. 2000 Oct; 81(Pt 10):2519-23.
- Blanchoin L, Pollard TD, Hitchcock-DeGregori SE. Inhibition of the Arp2/3 complex-nucleated actin polymerization and branch formation by tropomyosin. *Curr Biol*. 2001 Aug; 11(16):1300-4.
- Boxus M, Tignon M, Roels S, Toussaint JF, Walravens K, Benoit MA, Coppe P, Letesson JJ, Letellier C, Kerkhofs P. DNA immunization with plasmids encoding fusion and nucleocapsid proteins of bovine respiratory syncytial virus induces a strong cell-mediated immunity and protects calves against challenge. *J Virol*. 2007 Jul; 81(13):6879-89.
- Brasier AR, Spratt H, Wu Z, Boldogh I, Zhang Y, Garofalo RP, Casola A, Pashmi J, Haag A, Luxon B, Kurosky A. Nuclear heat shock response and novel nuclear domain 10 reorganization in respiratory syncytial virus-infected a549 cells identified by high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *J Virol*. 2004 Nov; 78(21):11461-76.
- Brooks AR, Harkins RN, Wang P, Qian HS, Liu P, Rubanyi GM. Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med*. 2004 Apr; 6(4):395-404.
- Burke E, Dupuy L, Wall C, Barik S. Role of cellular actin in the gene expression and morphogenesis of human respiratory syncytial virus. *Virology*. 1998 Dec; 252(1):137-48.
- Candeias JAN. Isolamento do vírus respiratório sincicial em crianças com quadro respiratório agudo. *Rev Inst Med Trop*. 1967; 0 (1):27-30.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Chanock RM, Finberg L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent. I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg.* 1957a; 66: 281-290.

Chanock RM, Finberg L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent. II. Epidemiological aspects of infection in infants and young children. *Am J Hyg.* 1957b; 66: 291-300.

Clarke SKR, Gardner PS, Poole PM, Simpson H, Tobin JOH. Respiratory syncytial virus infection: admission to hospital, industrial, urban and rural areas. Research Council subcommittee of Respiratory syncytial virus vaccines. *Br Med J.* 1978; 2:796-798.

Collins PL, Huang YT, Wertz GW. Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion (F) glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1984 Dec; 81(24):7683-7.

Collins PL, Mottet G. Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 1993 Jul; 74 (Pt 7):1445-50.

Collins PL, McIntosh, K, Chanock, R M. Respiratory syncytial virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Strauss SE, editors. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott – Raven Publishers; 2001.

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

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

Crowe JE Jr. Host responses to respiratory virus infection and immunization. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1999; 236:191-214. Review.

Curran J, Marq JB, Kolakofsky D. An N-terminal domain of the Sendai paramyxovirus P protein acts as a chaperone for the NP protein during the nascent chain assembly step of genome replication. *J Virol.* 1995 Feb; 69(2):849-55.

D'Elia C, Siqueira MM, Portes SA, Sant'Anna CC. Respiratory syncytial virus -- associated lower respiratory tract infections in hospitalized infants. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005 Jan-Feb; 38(1):7-10.

Dessen A, Volchkov V, Dolnik O, Klenk HD, Weissenhorn W. Crystal structure of the matrix protein VP40 from Ebola virus. *EMBO J* 2000 Aug; 19(16):4228-36.

DesMarais V, Ichetovkin I, Condeelis J, Hitchcock-DeGregori SE. Spatial regulation of actin dynamics: a tropomyosin-free, actin-rich compartment at the leading edge. *J Cell Sci.* 2002 Dec; 115(Pt 23):4649-60.

Dupuy LC, Dobson S, Bitko V, Barik S. Casein kinase 2-mediated phosphorylation of respiratory syncytial virus phosphoprotein P is essential for the transcription elongation activity of the viral polymerase: phosphorylation by casein kinase 1 occurs mainly at Ser (215) and is without effect. *J Virol.* 1999; 73:8384-8392.

Escher G, Hoang A, Georges S, Tchoua U, El-Osta A, Krozowski Z, Sviridov D. Demethylation using the epigenetic modifier, 5-azacytidine, increases the efficiency of transient transfection of macrophages. *J Lipid Res.* 2005 Feb; 46(2):356-65.

Evans JE, Cane PA, Pringle CR. Expression and characterisation of the NS1 and NS2 proteins of respiratory syncytial virus. *Virus Res.* 1996 Aug; 43(2):155-61.

Fjaerli HO, Bukholm G, Krog A, Skjaeret C, Holden M, Nakstad B. Whole blood gene expression in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *BMC Infect Dis.* 2006 Dec 13; 6:175.

Fearns R, Collins PL. Model for polymerase access to the overlapped L gene of respiratory syncytial virus. *J Virol.* 1999 Jan; 73(1):388-97.

Ghildyal R, Mills J, Murray M, Vardaxis N, Meanger J. Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. *J Gen Virol.* 2002 Apr; 83(Pt 4):753-7.

Ghildyal R, Baulch-Brown C, Mills J, Meanger J. The matrix protein of Human respiratory syncytial virus localises to the nucleus of infected cells and inhibits transcription. *Arch Virol.* 2003 Jul; 148(7):1419-29.

Ghildyal R, Ho A, Wagstaff KM, Dias MM, Barton CL, Jans P, Bardin P, Jans DA. Nuclear import of the respiratory syncytial virus matrix protein is mediated by importin beta1 independent of importin alpha. *Biochemistry.* 2005a Sep; 44(38):12887-95.

Ghildyal R, Li D, Peroulis I, Shields B, Bardin PG, Teng MN, Collins PL, Meanger J, Mills J. Interaction between the respiratory syncytial virus G glycoprotein cytoplasmic domain and the matrix protein. *J Gen Virol.* 2005b Jul; 86(Pt 7):1879-84.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1977 Jul; 36(1): 59-74.

Grosfeld H, Hill MG, Collins PL. 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. *J Virol.* 1995 Sep; 69(9):5677-86.

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

Hall CB, Powell KR, MacDonald NE, Gala CL, Menegus ME, Suffin SC, Cohen HJ. Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function. *N Engl J Med.* 1986 Jul; 315:77-81.

Harcourt JL, Brown MP, Anderson LJ, Tripp RA. CD40 ligand (CD154) improves the durability of respiratory syncytial virus DNA vaccination in BALB/c mice. *Vaccine.* 2003 Jun; 21(21-22):2964-79.

Harcourt JL, Anderson LJ, Sullender W, Tripp RA. Pulmonary delivery of respiratory syncytial virus DNA vaccines using macroaggregated albumin particles. *Vaccine.* 2004 Jun; 22(17-18):2248-60.

Handforth J, Friedland JS, Sharland M. Basic epidemiology and immunopathology of RSV in children. *Paediatr Respir Rev.* 2000 Sep; 1(3):210-4. Review.

Hardy RW, Wertz GW. The Cys(3)-His(1) motif of the respiratory syncytial virus M2-1 protein is essential for protein function. *J Virol.* 2000 Jul; 74(13):5880-5.

Heminway BR, Yu Y, Tanaka Y, Perrine KG, Gustafson E, Bernstein JM, Galinski MS. Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion. *Virology.* 1994 May; 200(2):801-5.

Henderson G, Murray J, Yeo RP. Sorting of the respiratory syncytial virus matrix protein into detergent-resistant structures is dependent on cell-surface expression of the glycoproteins. *Virology.* 2002 Sep; 300(2):244-54.

Hendricks DA, McIntosh K, Patterson JL. Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J Virol.* 1988 Jul; 62(7):2228-33.

Hodges BL, Taylor KM, Joseph MF, Bourgeois SA, Scheule RK. Long-term transgene expression from plasmid DNA gene therapy vectors is negatively affected by CpG dinucleotides. *Mol Ther.* 2004 Aug; 10(2):269-78.

Jeffree CE, Brown G, Aitken J, Su-Yin DY, Tan BH, Sugrue RJ. Ultrastructural analysis of the interaction between F-actin and respiratory syncytial virus during virus assembly. *Virology.* 2007 Dec; 369(2):309-23.

Kahn JS, Schnell MJ, Buonocore L, Rose JK. Recombinant vesicular stomatitis virus expressing respiratory syncytial virus (RSV) glycoproteins: RSV fusion protein can mediate infection and cell fusion. *Virology.* 1999 Feb; 254(1):81-91.

Karron RA, Buonagurio DA, Georgiu AF, Whitehead SS, Adamus JE, Clements-Mann ML, Harris DO, Randolph VB, Udem SA, Murphy BR, Sidhu MS. Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular

characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1997 Dec; 94(25):13961-6.

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

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

Kosaka IM, Carromeu C, Durigon EL, Ventura AM. Construction of adenoviral vectors expressing F and G glycoproteins of Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV). *Braz J Microbiol.* 2004; 35:167-172.

Latiff K, Meanger J, Mills J, Ghildyal R. Sequence and structure relatedness of matrix protein of human respiratory syncytial virus with matrix proteins of other negative-sense RNA viruses. *Clin Microbiol Infect.* 2004 Oct; 10(10):945-8.

Levine S, Klaiber-Franco R, Paradiso PR. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J Gen. Virol.* 1987 Sep; 68 (Pt 9):2521-4.

Li D, Jans DA, Bardin PG, Meanger J, Mills J, Ghildyal R. Association of respiratory syncytial virus M protein with viral nucleocapsids is mediated by the M2-1 protein. *J Virol.* 2008 Sep; 82(17):8863-70.

Li X, Sambhara S, Li CX, Ewasysshyn M, Parrington M, Caterini J, James O, Cates G, Du RP, Klein M. Protection against respiratory syncytial virus infection by DNA immunization. *J Exp Med.* 1998 Aug; 188(4):681-8.

Li X, Sambhara S, Li CX, Ettorre L, Switzer I, Cates G, James O, Parrington M, Oomen R, Du RP, Klein M. Plasmid DNA encoding the respiratory syncytial virus G protein is a promising vaccine candidate. *Virology.* 2000 Mar; 269(1):54-65.

Liuzzi M, Mason SW, Cartier M, et al. Inhibitors of respiratory syncytial virus replication target cotranscriptional mRNA guanylation by viral RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol.* 2005; 79: 13105-13115.

Lu B, Ma CH, Brazas R, Jin H. The major phosphorylation sites of the respiratory syncytial virus phosphoprotein are dispensable for virus replication in vitro. *J Virol* 2002; 76:10776-10784.

Mahy BWJ. *Virology a practical approach.* Oxford: IRL Pres; 1985

Malhotra R, Ward M, Bright H, Priest R, Foster MR, Hurle M, Blair E, Bird M. Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor(s) on epithelial cells. *Microbes Infect.* 2003 Feb; 5(2):123-33.

- Martinez X, Li X, Kovarik J, Klein M, Lambert PH, Siegrist CA. Combining DNA and protein vaccines for early life immunization against respiratory syncytial virus in mice. *Eur J Immunol*. 1999 Oct; 29(10):3390-400.
- Marty A, Meanger J, Mills J, Shields B, Ghildyal R. Association of matrix protein of respiratory syncytial virus with the host cell membrane of infected cells. *Arch Virol*. 2004 Jan; 149(1):199-210.
- McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*. 2000; 16:404-405. Disponível em <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> [2003 Jun 9].
- Miller M, Cho JY, Baek KJ, Castaneda D, Nayar J, Rodriguez M, Roman M, Raz E, Broide DH. Plasmid DNA encoding the respiratory syncytial virus G protein protects against RSV-induced airway hyperresponsiveness. *Vaccine*. 2002 Jul; 20(23-24):3023-33.
- Morris JAJr, Blount RE, Savage RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol. Med*. 1956; 92:544-549.
- Murphy BR, Collins PL. Live-attenuated virus vaccines for respiratory syncytial and parainfluenza viruses: applications of reverse genetics. *J Clin Invest*. 2002 Jul; 110(1):21-7. Review.
- Oien NL, Brideau RJ, Walsh EE, Wathen MW. Induction of local and systemic immunity against human respiratory syncytial virus using a chimeric F G glycoprotein and cholera toxin B subunit. *Vaccine*. 1994 Jun; 12(8):731-5.
- Orvell C, Norrby E, Mufson MA. Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against five structural components of human respiratory syncytialvirus subgroup B. *J Gen Virol*. 1987; 68:3125-3135
- Rodriguez 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. *J Gen. Virol*. 2004 Mar; 85(Pt 3):709-19.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning a laboratory manual*. 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Sanderson CM, McQueen NL, Nayak DP. Sendai virus assembly: M protein binds to viral glycoproteins in transit through the secretory pathway. *J Virol*. 1993 Feb; 67(2):651-63.
- Shaw G, Kamen R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*. 1986; 46:659-667.
- Shi J, Blundell TL, Mizuguchi K. *J Mol Biol*. 2001; 310(1):243-57 [serial on the Internet]. Disponível em: <http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/~fugue/>

Schubert U, Antón LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*. 2000 Apr; 404(6779):770-4.

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

Stricker, R., Mottet, G, Roux, L. The Sendai virus matrix protein appears to be recruited in the cytoplasm by the viral nucleocapsid to function in viral assembly and budding. *J Gen Virol*. 1994; 75:1031–1042.

Takimoto T, Murti KG, Bousse T, Scroggs RA, Portner A. Role of matrix and fusion proteins in budding of Sendai virus. *J Virol*. 2001 Dec; 75(23):11384-91.

Taylor G, Bruce C, Barbet AF, Wyld SG, Thomas LH. DNA vaccination against respiratory syncytial virus in young calves. *Vaccine*. 2005 Jan; 23(10):1242-50.

Techaarpornkul S, Barretto N, Peeples ME. Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. *J Virol*. 2001; 75:6825-6834.

Teng MN, Collins PL. Altered growth characteristics of recombinant respiratory syncytial viruses which do not produce NS2 protein. *J Virol*. 1999 Jan; 73(1):466-73.

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

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

Tree JA, Bembridge G, Hou S, Taylor G, Fashola-Stone E, Melero J, Cranage MP. An assessment of different DNA delivery systems for protection against respiratory syncytial virus infection in the murine model: gene-gun delivery induces IgG in the lung. *Vaccine*. 2004 Jun; 22(19):2438-43.

Ulmer JB, DeWitt CM, Chastain M, Friedman A, Donnelly JJ, McClements WL, Caulfield MJ, Bohannon KE, Volkin DB, Evans RK. *Vaccine*. 1999 Aug; 18(1-2):18-28.

Weber E, Humbert B, Streckert HJ, Werchau H. Nonstructural protein 2 (NS2) of respiratory syncytial virus (RSV) detected by an antipeptide serum. *Respiration*. 1995; 62(1):27-33.

Wyatt LS, Whitehead SS, Venanzi KA, Murphy BR, Moss B. Priming and boosting immunity to respiratory syncytial virus by recombinant replication-defective vaccinia virus MVA. *Vaccine*. 1999 Oct; 18(5-6):392-7.

Yewdell JW, Schubert U, Bennink JR. At the crossroads of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules. *J Cell Sci.* 2001 Mar; 114(Pt 5):845-51. Review.

Zhang XX, Thomis DC, Samuel CE. Isolation and characterization of a molecular cDNA clone of a human mRNA from interferon-treated cells encoding nucleolar protein B23, numatrin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989 Oct; 164(1):176-84.