

RESSALVA

**Atendendo solicitação do(a) autor(a), o
texto completo deste documento será
disponibilizado somente a partir de
10/07/2027.**

Raphael Vinicius Rodrigues Dias

**Caracterização de mudanças conformacionais do domínio
globular da proteína M2-1 do hRSV e hMPV: mecanismos que
envolvem o equilíbrio aberto-fechado e implicações.**

Relatório de Pós-Doutorado realizado na
Universidade Estadual Paulista (UNESP).
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
Câmpus de São José do Rio Preto

Supervisor: Prof. Dr. Ícaro Putinhon Caruso

FAPESP - 2023/09642-7

**São José do Rio Preto, SP
Julho de 2025**

RESUMO

O Vírus Sincicial Respiratório humano (hRSV) e o Metapneumovírus humano (hMPV) são os agentes patológicos de doenças respiratórias agudas mais comum em recém-nascidos, crianças e idosos, responsável por doenças como bronquiolite e pneumonia. Dentre as proteínas codificadas pelos vírus, a M2-1 destaca-se por atuar como um co-fator transcricional que impede a dissociação prematura do complexo da polimerase, e que, sua má funcionalidade implica em efeitos no ciclo replicativo viral. Estruturalmente, a M2-1 é uma proteína multidomínios formada por quatro subunidades monoméricas, sendo estas compostas por quatro diferentes domínios. Estudos recentes mostram que esse rearranjo tridimensional das subunidades é flexível, apresentando conformações “abertas” e “fechadas”, trazendo uma nova característica dinâmica para o funcionamento de M2-1 e possibilitando por exemplo sua interação simultânea com a fosfoproteína viral e o RNA mensageiro nascente. Ainda, é relatado que a estabilidade de ambas as conformações e o equilíbrio entre elas são importantes para a função de M2-1. Nesse contexto, o presente projeto tem como objetivo modelar e caracterizar computacionalmente as mudanças conformacionais entre os estados aberto e fechado das proteínas M2-1 do hRSV e hMPV empregando modelos minimalistas que permitem a dinâmica conformacional entre essas diferentes conformações. A partir dos dados obtidos, refinamos nosso modelo e utilizamos como ponto de partida para a elucidação de mecanismos que envolvem essas transições, identificando regiões alvo para mutações e desenho racional de fármacos. A ausência de uma interpretação molecular exploratória das funções associadas à dinâmica conformacional da proteína M2-1 ressaltam a importância desse projeto e suas elucidações contribuirá para uma compreensão detalhada de suas atividades no processo de transcrição viral, assim como para o desenvolvimento de novas estratégias de combate ao vírus que visam interromper o ciclo replicativo viral.

Palavras chaves: proteína M2-1. hRSV. hMPV. Mudanças Conformacionais. Dinâmica Molecular. Modelagem Molecular. Modelos baseado em estrutura. Desenho Racional de Farmacos.

1. Introdução

A família dos Pneumovírus (Pneumoviridae) inclui o vírus sincicial respiratório humano (hRSV) e o metapneumovírus humano (hMPV). Esses vírus são os principais agentes causadores de doenças respiratórias agudas, tais como pneumonia e bronquiolite em crianças em todo o mundo além de serem os principais responsáveis pela morbidade respiratória em idosos, pessoas imunocomprometidas e com doença cardiorrespiratória (1–3). Enquanto o genoma do hRSV codifica onze proteínas, o genoma do hMPV codifica nove proteínas. Apesar dessa diferença, ambos os vírus compartilham organizações genômicas e mecanismos de transcrição e replicação semelhantes. O RNA negativo de fita simples enrolado em contato com a proteína N do nucleocapsídeo é usado como modelo para transcrição e replicação. A replicação genômica do RNA é conduzida pela proteína L da RNA polimerase junto com a fosfoproteína P. A proteína M2-1, exclusiva do pneumovírus, atua como um cofator e é necessária para a transcrição subgenômica eficiente do mRNA (4).

Além de atuar como um cofator para a transcrição genômica do vírus, prevenindo o término prematuro da transcrição de mRNAs longos e melhorando a síntese de mRNAs, M2-1 também participa do tráfego de mRNA pós-transcricional e acúmulo transitório de mRNAs virais em organelas sem membrana, antes de liberar mRNAs no citosol para tradução. Também é associada à montagem de partículas virais, mediando as interações entre o N nucleocapsídeo e a proteína de matriz M. Além disso, M2-1 tem um papel importante na morfogênese viral (5–7). Todas essas interações e funções tornam M2-1 de interesse significativo para a compreensão do ciclo de vida e infecção do Pneumovírus (8).

Estruturalmente, a proteína M2-1 é composta em sua maioria por alfa hélices e apresenta uma estrutura tridimensional dividida em quatro domínios, mostrados na Figura 1. O domínio “zinc finger” que é composto por resíduos iniciais do N-terminal os quais se ligam a um átomo de zinco e auxiliam no processo de transcrição; o domínio de oligomerização que é responsável pela formação do tetrâmero; o domínio globular que atua diretamente na interação com a proteína P e o RNA; e o domínio C-terminal não estruturado com baixo grau de conservação (9, 10).

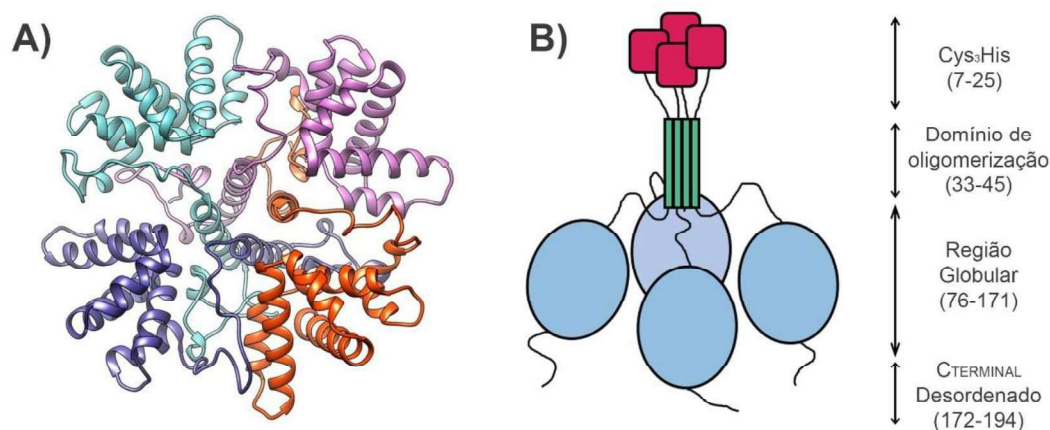


Figura 1: Estrutura da proteína M2-1 do hRSV (A) Estrutura tridimensional M2-1 do hRSV (PDB: 4C3B) determinada por cristalografia de raios-X. Representação em cartoon da estrutura tetramérica da proteína com as cadeias monoméricas coloridas em diferentes cores. (B) Representação do arranjo tetramérico tridimensional da proteína M2-1 do hRSV. Uma unidade monomérica da proteína é composta por um domínio de ligação ao zinco (vermelho), um domínio de oligomerização (verde), um domínio globular de ligação à proteína P e ao RNA (azul) e uma região não estruturada do C-terminal. Essa representação foi adaptada de (9).

Embora semelhante em estrutura tridimensional, a estrutura cristalina do tetrâmero M2-1 do hMPV revela uma unidade assimétrica com um dos protômeros exibindo uma conformação aberta em relação à estrutura cristalina da M2-1 do hRSV, como mostrado na Figura 2A e 2B (10–12). A sobreposição dessas estruturas, mostrada da Figura 2C revela também que a mudança conformacional acontece de maneira global na proteína, afetando todos os outros domínios, mesmo que de maneira sucinta.

Nos estudos proposto por Leyrat e colaboradores (12), na configuração “aberta” de M2-1, um dos domínios globulares do tetrâmero encontra-se afastado do restante da proteína, devido a uma rotação ocorrida no linker flexível entre α -hélice de oligomerização e o domínio globular (monômero em cor laranja na Figura 2A e B). Utilizando simulações de dinâmica molecular e experimentos de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (Small Angle X-ray Scattering – SAXS), eles também reportaram um equilíbrio dinâmico entre conformações “aberta” e “fechada” para a M2-1 do hMPV em solução, sendo que a conformação completamente “fechada” seria estruturalmente semelhante ao arranjo determinado para proteína do hRSV. Dentro desses estudos, também foi demonstrado que na presença de RNA a conformação “fechada” da M2-1 é prevalente, sendo essa estabilizada pela ligação simultânea da molécula de ácido nucleico a região zinc finger e ao domínio globular da proteína (12). Desse modo, foi provado que a M2-1 constitui uma plataforma flexível para reconhecimento de RNA.

Em suma, esses estudos demonstram importância do equilíbrio dinâmico entre essas diferentes conformações para com as funções de M2-1. Essas mudanças conformacionais vão de encontro com as características da M2-1 atuando em diversas frentes dentro do sistema viral, cada uma compatível com funções específicas.

Mudanças conformacionais é um estudo de extrema importância para entendimento do mecanismo molecular das proteínas. Os avanços computacionais tem permitido construções e modelagens que proporcionam transições conformacionais, como podemos ver em trabalhos recentes (13–16). Dentre os trabalhos, temos exemplos de proteínas que mudam estruturalmente para reconhecimento de DNA, estabilização de complexos, fusão da membrana viral com hospedeiro e também para atividade catalítica. Esses métodos computacionais combinam as informações estruturais experimentais para explorar toda a transição entre essas, mostrando-se uma maneira eficiente de amostrar o espaço conformacional e destacar novas visões e possibilidades para o estudo de proteínas.

Nesse cenário, a modelagem molecular e os estudos da dinâmica conformacional da M2-1 são substancialmente importantes para uma descrição completa dos mecanismos de atuação dessa proteína. Um detalhamento de mecanismos de transição local (incluindo pequenos movimentos de hélices e coils) e aspecto global (movimentos de subunidades completas) são relevantes para o desenvolvimento de novas estratégias ao combate do hRSV e hMPV. Essa elucidação nos possibilita diversos outros tipos de análises, como por exemplo a construção dirigida de potenciais antivirais que poderiam estabilizar a conformação “aberta” ou “fechada” e interferir no equilíbrio conformacional de M2-1.

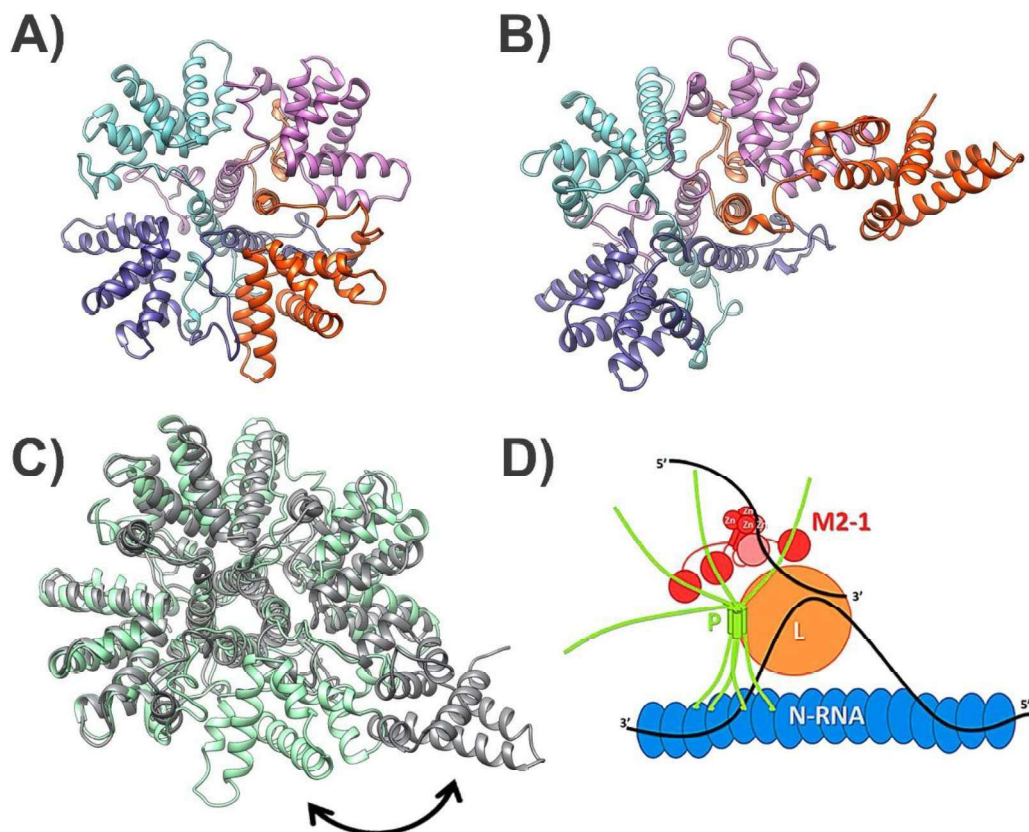


Figura 2: Comparação estrutural da proteína M2-1 do hRSV e hMPV. (A, B) Estrutura tridimensional M2-1 do hRSV (PDB: 4C3B) e hMPV (PDB:4CS7) respectivamente, ambas determinadas por cristalografia de raios-X. A representação é em cartoon e colorida de acordo com cadeias monoméricas (C) Sobreposição das estruturas mostradas em A e B, com a estrutura da M2-1 do hRSV colorida em ciano e do hMPV em cinza. Essa sobreposição nos mostra que as mudanças vão além do deslocamento do domínio, afetando globalmente a proteína por um todo. (D) Modelo hipotético de reconhecimento co-transcricional de RNA mensageiro viral pela M2-1 em associação com o complexo transcricional viral. O nucleocapsídeo é representado em azul, e associado com o RNA (linha preta) e com a proteína tetramérica P em verde. A proteína P liga-se a polimerase viral L (laranja) e o tetrâmero M2-1, o qual é mostrado em vermelho. Mudanças conformacionais induzidas pelo RNA sob reconhecimento de sequências de ácido nucleico pela M2-1 são ilustradas pelo “fechamento” de um único domínio globular da proteína ligado (vermelho claro) ao RNA de fita simples (12).

6. Comentários do Supervisor

O Dr. Raphael Vinicius Rodrigues Dias desempenhou um papel notável no desenvolvimento do projeto de pesquisa, demonstrando competência e dedicação também nas atividades de docência (aulas ministradas nas disciplinas de Laboratório de Física IV e Laboratório de Física Moderna para curso de Física/Física Biológica e na disciplina de Mecânica Quântica Aplicada oferecida no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas), iniciativas de extensão (projeto “Aplicação da Física na Biologia e Medicina em Benefício da Saúde Humana”) e a coorientação de alunos de pós-graduação. Destaca-se seu perfil colaborativo, particularmente na difusão do conhecimento e na aplicação de tecnologias voltadas para estudos de biofísica computacional de macromoléculas de interesse biológico. O Dr. Raphael mostrou

excelência na execução das tarefas propostas, contribuindo significativamente para os objetivos do projeto e para o desenvolvimento dos estudos computacionais de proteínas que o grupo de pesquisa realizou e está realizando. Em função de sua atuação exemplar, conforme descrito neste relatório, considero o desempenho do Dr. Raphael como excepcional. Como supervisor, aprovo integralmente este relatório e parabenizo o Dr. Raphael pelas valiosas contribuições prestadas, pelo comprometimento com a produção científica e pela ativa participação na vida acadêmica do Departamento de Física e da Pós-Graduação ao longo do período avaliado.

7. Referencias

- 1 SCHELTEMA, N. M. et al. Global respiratory syncytial virus-associated mortality in young children (rsv gold): a retrospective case series. *The Lancet Global Health*, Elsevier, v. 5, n. 10, p. e984–e991, 2017.
- 2 ECHEVARRÍA-ZUNO, S. et al. Infection and death from influenza a h1n1 virus in mexico: a retrospective analysis. *The Lancet*, Elsevier, v. 374, n. 9707, p. 2072–2079, 2009.
- 3 PANDA, S. et al. Human metapneumovirus: review of an important respiratory pathogen. *International journal of infectious diseases*, Elsevier, v. 25, p. 45–52, 2014.
- 4 FEARNES, R.; COLLINS, P. L. Role of the m2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *Journal of virology*, Am Soc Microbiol, v. 73, n. 7, p. 5852–5864, 1999.
- 5 RINCHEVAL, V. et al. Functional organization of cytoplasmic inclusion bodies in cells infected by respiratory syncytial virus. *Nature communications*, Nature Publishing Group UK London, v. 8, n. 1, p. 563, 2017.
- 6 LI, D. et al. Association of respiratory syncytial virus m protein with viral nucleocapsids is mediated by the m2-1 protein. *Journal of virology*, Am Soc Microbiol, v. 82, n. 17, p. 8863–8870, 2008.
- 7 LILJEROOS, L. et al. Architecture of respiratory syncytial virus revealed by electron cryotomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 110, n. 27, p. 11133–11138, 2013.

- 8 ESPERANTE, S. A. et al. Mechanism of tetramer dissociation, unfolding, and oligomer assembly of pneumovirus m2-1 transcription antiterminators. *ACS omega*, ACS Publications, v. 3, n. 11, p. 14732–14745, 2018.
- 9 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 pathogens*, Public Library of Science San Francisco, USA, v. 8, n. 5, p. e1002734, 2012.
- 10 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 111, n. 4, p. 1580–1585, 2014.
- 11 ESPERANTE, S. A. et al. The respiratory syncytial virus transcription antiterminator m2–1 is a highly stable, zinc binding tetramer with strong ph-dependent dissociation and a monomeric unfolding intermediate. *Biochemistry*, ACS Publications, v. 50, n. 40, p. 8529–8539, 2011.
- 12 LEYRAT, C. et al. Drastic changes in conformational dynamics of the antiterminator m2-1 regulate transcription efficiency in pneumovirinae. *Elife*, eLife Sciences Publications, Ltd, v. 3, p. e02674, 2014.
- 13 DIAS, R. V. R. et al. Csk α c helix: A computational analysis of an essential region for conformational transitions. *The Journal of Physical Chemistry B*, ACS Publications, 2022.
- 14 CHU, X. et al. Dynamic conformational change regulates the protein-dna recognition: an investigation on binding of a γ -family polymerase to its target dna. *PLoS computational biology*, Public Library of Science San Francisco, USA, v. 10, n. 9, p. e1003804, 2014.
- 15 LIN, X. et al. Order and disorder control the functional rearrangement of influenza hemagglutinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 111, n. 33, p. 12049–12054, 2014.
- 16 MORCOS, F. et al. Coevolutionary signals across protein lineages help capture multiple protein conformations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 110, n. 51, p. 20533–20538, 2013.

- 17 CLEMENTI, C.; NYMEYER, H.; ONUCHIC, J. N. Topological and energetic factors: what determines the structural details of the transition state ensemble and “en-route” intermediates for protein folding? an investigation for small globular proteins. *Journal of molecular biology*, Elsevier, v. 298, n. 5, p. 937–953, 2000.
- 18 JANA, B.; MORCOS, F.; ONUCHIC, J. N. From structure to function: the convergence of structure-based models and co-evolutionary information. *Physical Chemistry Chemical Physics*, Royal Society of Chemistry, v. 16, n. 14, p. 6496–6507, 2014.
- 19 WHITFORD, P. C. et al. Conformational transitions of adenylate kinase: switching by cracking. *Journal of molecular biology*, Elsevier, v. 366, n. 5, p. 1661–1671, 2007.
- 20 LAMMERT, H.; SCHUG, A.; ONUCHIC, J. N. Robustness and generalization of structure-based models for protein folding and function. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Wiley Online Library, v. 77, n. 4, p. 881–891, 2009.
- 21 BRYNGELSON, J. D. et al. Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: a synthesis. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Wiley Online Library, v. 21, n. 3, p. 167–195, 1995.
- 22 NELSON, O. J.; PETER, G. W. Theory of protein folding. *Curr Opin Struct Biol*, v. 14, n. 1, p. 70–5, 2004.
- 23 NEELAMRAJU, S.; WALES, D. J.; GOSAVI, S. Protein energy landscape exploration with structure-based models. *Current opinion in structural biology*, Elsevier, v. 64, p. 145–151, 2020.
- 24 ONUCHIC, J. N.; LUTHEY-SCHULTEN, Z.; WOLYNES, P. G. Theory of protein folding: the energy landscape perspective. *Annual review of physical chemistry*, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, v. 48, n. 1, p. 545–600, 1997.
- 25 SOBOLEV, V. et al. Molecular docking using surface complementarity. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Wiley Online Library, v. 25, n. 1, p. 120–129, 1996.

- 26 NOEL, J. K.; WHITFORD, P. C.; ONUCHIC, J. N. The shadow map: a general contact definition for capturing the dynamics of biomolecular folding and function. *The journal of physical chemistry B*, ACS Publications, v. 116, n. 29, p. 8692–8702, 2012.
- 27 SCHUMANN, F. H. et al. Combined chemical shift changes and amino acid specific chemical shift mapping of protein–protein interactions. *Journal of biomolecular NMR*, Springer, v. 39, n. 4, p. 275–289, 2007.
- 28 NOEL, J. K. et al. Smog 2: a versatile software package for generating structure-based models. *PLoS computational biology*, Public Library of Science San Francisco, CA USA, v. 12, n. 3, p. e1004794, 2016.
- 29 JUNIOR, A. B. O. et al. Exploring energy landscapes of intrinsically disordered proteins: Insights into functional mechanisms. *Journal of Chemical Theory and Computation*, ACS Publications, 2021.
- 30 SPOEL, D. V. D. et al. Gromacs: fast, flexible, and free. *Journal of computational chemistry*, Wiley Online Library, v. 26, n. 16, p. 1701–1718, 2005.
- 31 ABRAHAM, M. J. et al. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, Elsevier, v. 1, p. 19–25, 2015.
- 32 KUMAR, S. et al. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. i. the method. *Journal of computational chemistry*, Wiley Online Library, v. 13, n. 8, p. 1011–1021, 1992.
- 33 JR, A. B. O. et al. Distinguishing biomolecular pathways and metastable states. *Journal of chemical theory and computation*, ACS Publications, v. 15, n. 11, p. 6482–6490, 2019.
- 34 OLIVEIRA, V. M. D. et al. pH and charged mutations modulate cold shock protein folding and stability: A constant pH monte carlo study. *Journal of chemical theory and computation*, ACS Publications, v. 16, n. 1, p. 765–772, 2019.