

FERNANDO MOREIRA SIMABUCO

**EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS N E P DO VÍRUS
RESPIRATÓRIO SINCICIAL HUMANO:
ESTUDOS FUNCIONAIS E DE IMUNIZAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo (USP), Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) e Instituto Butantan para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Armando Morais Ventura

São Paulo
2008

RESUMO

Simabuco FM. Expressão das proteínas N e P do Vírus Respiratório Sincicial Humano: estudos funcionais e de imunização [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

O Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV), membro da família *Paramyxoviridae*, é um vírus envelopado cujo genoma é uma fita simples, não-segmentada, de RNA de polaridade negativa. É considerado o patógeno mais importante do trato respiratório de bebês e crianças e atualmente não existe vacina eficiente. A proteína N é responsável pela formação do nucleocapsídeo, dando-lhe o aspecto helicoidal ao interagir com o genoma. A proteína P é responsável por garantir a estabilidade e o posicionamento da RNA polimerase RNA dependente no complexo ribonucleoprotéico para a síntese do RNA (agindo como um co-fator), e a especificidade da proteína N no encapsidamento do RNA viral (agindo como uma chaperona). As proteínas N e P foram expressas em bactérias, purificadas e usadas para a produção de anticorpos policlonais em camundongos. Estudos *in silico* permitiram a predição de regiões desordenadas para a proteína P, as quais foram identificadas por espectrometria de massa como regiões hiper sensíveis a proteases. A otimização dos genes N e P, processo que envolve a troca das bases do DNA para adaptação dos códons ao uso humano e a eliminação de sítios de poliadenilação prematuros, permitiram uma forte e eficiente expressão das proteínas N e P em células humanas através de um promotor da RNA polimerase II. Vacinas de DNA contendo os genes otimizados foram testadas em camundongos e geraram forte resposta imune humoral. As proteínas N e P expressas em células humanas foram imunoprecipitadas e analisadas quanto a interações com proteínas celulares, identificadas por espectrometria de massa. A proteína P mostrou ser capaz de interagir com a HSP70, proteína celular responsável por induzir a conformação correta de diversas proteínas. Trabalhos anteriores demonstraram a interação do complexo de replicação do HRSV com a HSP70. Nossos dados indicam que a proteína P deve intermediar essa interação, que pode estar relacionada à função de chaperona dada à proteína P. Por fim, um sistema Minigenoma alternativo, usando um promotor da RNA polimerase II, foi construído para o HRSV mas pouca ou nula atividade foi detectada.

Palavras-chave: Vírus Respiratório Sincicial Humano. Proteína N. Proteína P. Expressão e purificação de proteínas. Domínios desordenados. Otimização de genes. Vacinas de DNA. Imunoprecipitação. Minigenoma.

ABSTRACT

Simabuco FM. Expression of Human Respiratory Syncytial Virus N and P proteins: functional and immunization studies [Ph.D. Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

The Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV), member of the *Paramyxoviridae* family, is an enveloped virus and its genome is a non-segmented single stranded RNA of negative polarity. It is considered the most important pathogen of the respiratory tract of infants and neonates and there is no approved vaccine against HRSV. The N protein interaction with the genomic RNA is responsible for the nucleocapsid assembly, giving it a helical form. The P protein is responsible for the stability and the correct placement of the RNA dependent RNA polymerase in the ribonucleoprotein complex for the RNA synthesis (acting as a cofactor), and the specificity of the N protein for the viral RNA encapsidation (acting as a chaperone). The N and P proteins were expressed in bacteria, purified and used for the production of polyclonal antibodies in mice. *In silico* studies allowed the prediction of intrinsically disordered domains for P protein, which were identified by mass spectrometry as protease hyper sensitive regions. The optimization of N and P genes, which is done by the codon exchange for adaptation to the human codon usage and the elimination of premature poliadenilation sites, allowed a robust and efficient expression of the N and P proteins in human cells by an RNA polymerase II promoter. DNA vaccines containing the optimized genes were tested in mice and generated strong humoral immune response. The N and P proteins expressed in human cells were immunoprecipitated and analyzed for interactions with cellular proteins, which were identified by mass spectrometry. The P protein was able to interact with the HSP70 protein, responsible for the induction of the correct conformation of several cellular proteins. A previous work showed the interaction between the HRSV replication complex and the HSP70. Our data indicate tha P protein mediates this interaction, which may be related with its chaperone function. Finally, an alternative Minigenome system, using an RNA polymerase II promoter, was developed for HRSV but low or no activity was detected.

Key words: Human Respiratory Syncytial Virus. N protein. P protein. Protein expression and purification. Intrinsically disordered domains. Gene optimization. DNA vaccines. Immunoprecipitation. Minigenome.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Taxonomia

O Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) é um membro da ordem *Mononegavirales*, que agrupa vírus contendo genoma de RNA de polaridade negativa e fita simples não segmentada. O HRSV ainda se encontra dentro da família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae*, gênero *Pneumovirus*, segundo as normas do *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV). A ordem *Mononegavirales* possui ainda outros representantes importantes, como o vírus da raiva (família *Rhabdoviridae*), o vírus Ebola (família *Filoviridae*) e o vírus do sarampo (família *Paramyxoviridae*). O nome do HRSV é decorrente de seu efeito citopático característico, a formação de sincícios em cultura de células (Figura 1). Sincícios são células maiores e multinucleadas decorrentes da fusão de células adjacentes.

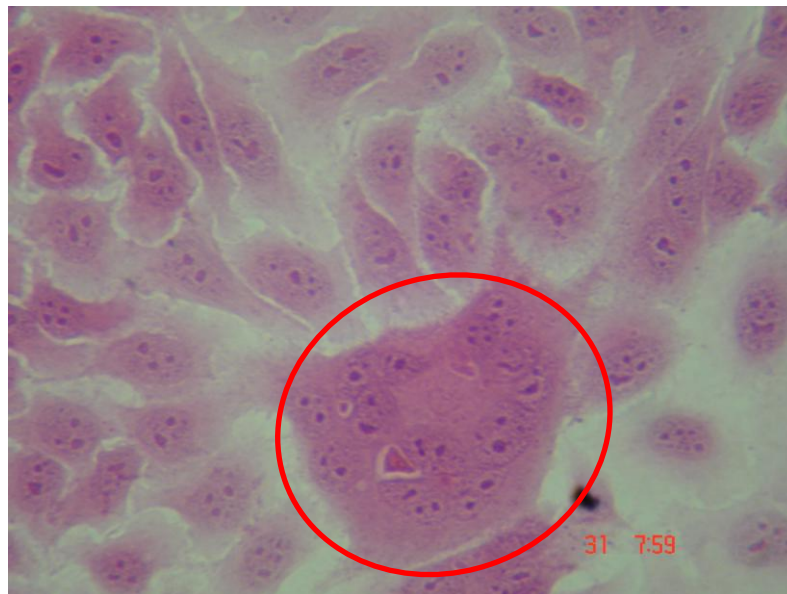


Figura 1. Cultura de células HEp-2 infectadas com o HRSV, cepa A2. Um sincício, efeito citopático característico do vírus, está circulado em vermelho. Coloração por hematoxilina-eosina.

1.2 Sintomatologia e Grupos-alvo

Os principais sintomas da infecção pelo HRSV são semelhantes aos da gripe ou do resfriado comum, ou seja, congestão nasal, tosse, falta de ar e febre, embora quadros clínicos mais graves como bronquite e pneumonia sejam comuns (Holberg, 1991). O HRSV é a

mais importante causa de doença respiratória severa em recém-nascidos, bebês e crianças, destacando-se bebês prematuros ou com doença pulmonar crônica ou com doença cardíaca congênita (Zambon, 1999) Além disso, outros estudos ainda enfatizam a importância do HRSV em pacientes imunocomprometidos de todas as idades, tais como os transplantados de medula óssea (Hall *et al.*, 1986), em idosos (Han, 1999), e até mesmo em adultos de forma geral (Falsey e Walsh, 2000). A infecção por HRSV pode ainda estar associada à asma (Lemanske, 2004) e à co-infecção bacteriana do trato respiratório (Thorburn *et al.*, 2006).

1.3 Histórico e Epidemiologia

O HRSV foi originalmente isolado em 1956 de chimpanzés que apresentavam sintomatologia semelhante ao resfriado comum (Blount *et al.*, 1956). Seu isolamento em humanos se deu em 1957 (Chanock *et al.*, 1957), e desde então é considerado o patógeno mais prevalente do trato respiratório de bebês e crianças.

Dois grandes grupos antigênicos para o HRSV são descritos, A e B, e segregados segundo ensaios de neutralização *in vitro* (Coates *et al.*, 1966) e reações com anticorpos monoclonais (Durigon *et al.*, 1999). Os grupos A e B geralmente circulam simultaneamente, apesar do grupo A ser um pouco mais prevalente. Além disso, as re-infecções são comuns, sugerindo que a imunidade dada por uma infecção natural é incompleta (Collins e Graham, 2008).

O HRSV é responsável por 38% das infecções do trato respiratório inferior no primeiro ano de vida, e mais da metade desses bebês têm re-infecções dentro de um ano (Schmidt *et al.*, 2004). Um estudo feito em São Paulo, Brasil, mostrou que 41,8% das crianças hospitalizadas com doença no trato respiratório inferior apresentavam o HRSV (Vieira *et al.*, 2001).

Nos Estados Unidos, durante o ano de 1995, o HRSV foi responsável por um terço das internações causadas por doenças do trato respiratório inferior entre crianças com menos de um ano (Sullender, 2000). Ainda nesse país, cerca de US\$ 2,25 bilhões são gastos com crianças com idade menor que um ano hospitalizadas devido a infecções no trato respiratório inferior, sendo que 14 a 26 % desse montante são devidos ao tratamento contra o HRSV (Schmidt *et al.*, 2004).

1.4 Estrutura do Genoma e do Vírião

O HRSV é um vírus envelopado cujo genoma consiste em uma fita simples de RNA não segmentada e com polaridade negativa. O genoma contém 15.222 nucleotídeos (cepa A2) e 10 genes que codificam 11 proteínas: NS1 e NS2 (não-estruturais), N (nucleocapsídeo), 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). A organização dos genes no genoma está esquematizada na Figura 2.

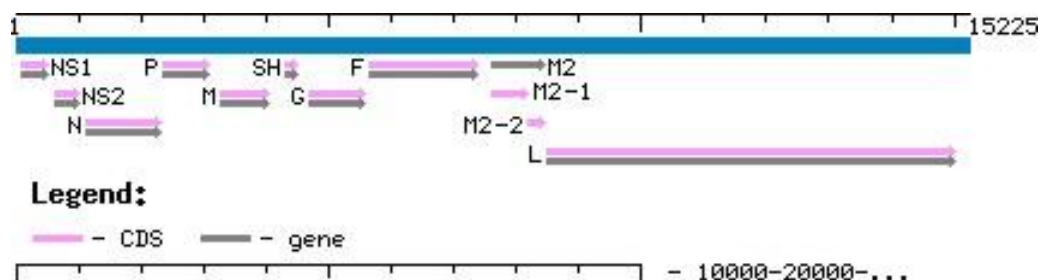


Figura 2. Organização dos genes no genoma do HRSV, cepa A2.
 FONTE: *National Center for Biotechnology Information, USA.*

O nucleocapsídeo viral é composto pelo RNA e pelas proteínas M2-1, N, P e L, sendo que estas duas últimas formam a polimerase do vírus. O envelope é uma bicamada lipídica obtida da membrana da célula hospedeira, onde se encontram três glicoproteínas transmembrânicas: G, F e SH. Além disso, existe uma matriz protéica na superfície interna do envelope, formada pela proteína M (Collins *et al.*, 2001). Um modelo da estrutura viral de um *Pneumovirus* é mostrado na Figura 3.

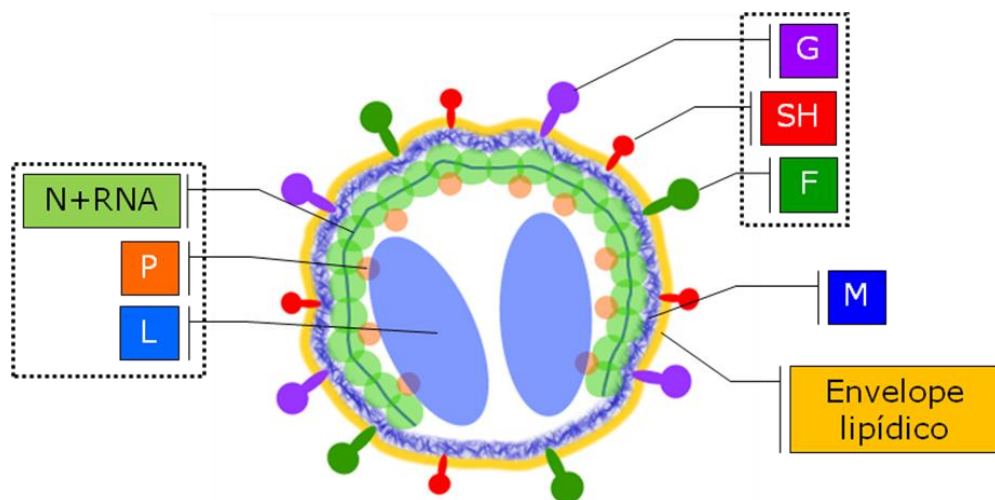


Figura 3. Estrutura da partícula viral do HRSV.

Quando visualizados em microscópio eletrônico, os vírions aparecem como esferas pleomórficas de 150 a 300 nm de diâmetro (Figura 4). Em células polarizadas, o brotamento se dá na membrana apical da célula (Roberts *et al.*, 1995). A microscopia eletrônica revela também que os nucleocapsídeos têm forma de filamentos e de estruturas menores em forma de anel (Figura 5), decorrentes da quebra desses filamentos, ambos com diâmetros de 14 a 16 nm (Meric *et al.*, 1994; Bhella *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2003).

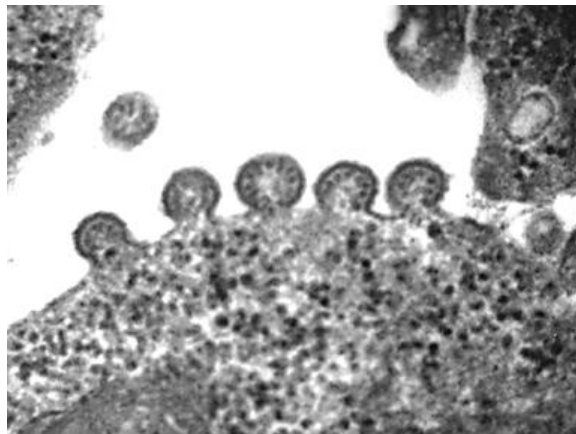


Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão do HRSV brotando de células humanas.
FONTE: *Department of Pediatrics, University of North Caroline, USA.*

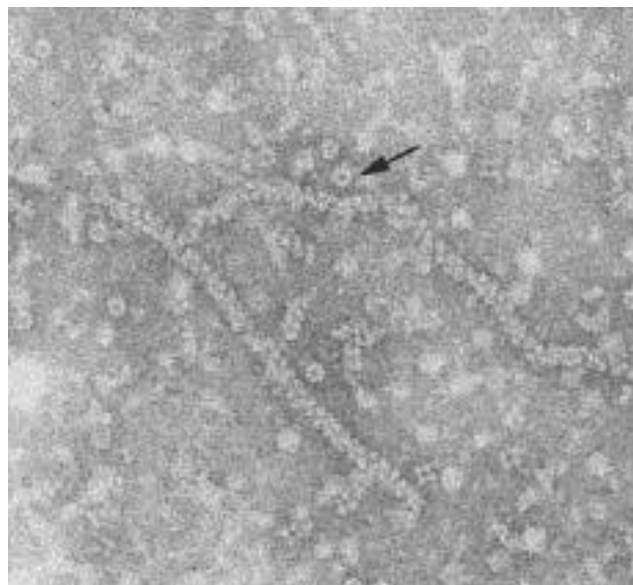


Figura 5. Microscopia eletrônica de transmissão de nucleocapsídeos do HRSV em forma de filamentos ou anéis (indicado pela seta). Os anéis formam-se em decorrência da quebra mecânica da estrutura filamentosa.
FONTE: *Murphy et al., 2003.*

1.5 Ciclo Replicativo

Tal como os demais membros da família *Paramyxoviridae*, os processos de transcrição e replicação do genoma apresentam-se inteiramente no citoplasma, sem aparente envolvimento nuclear. A infecção pelo HRSV resulta na formação de corpúsculos de inclusão citoplasmáticos, sendo estes positivos para as proteínas N, P, M2-1 (Garcia *et al.*, 1993) e L (Carromeu *et al.*, 2007), sugerindo que nessas estruturas há concentração dessas proteínas e intensa replicação e transcrição viral.

Um esquema geral do ciclo replicativo do vírus da raiva, também um mononegavírus, é mostrado na Figura 6 para ilustrar as etapas de replicação, sendo os comentários e citações a seguir referentes ao HRSV. A infecção se inicia com a ligação da glicoproteína G em um receptor da célula hospedeira, possivelmente uma glicosaminoglicana (Feldman *et al.*, 1999). Em seguida, a proteína F media a fusão das membranas viral e celular, permitindo a liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma (Collins *et al.*, 2001).

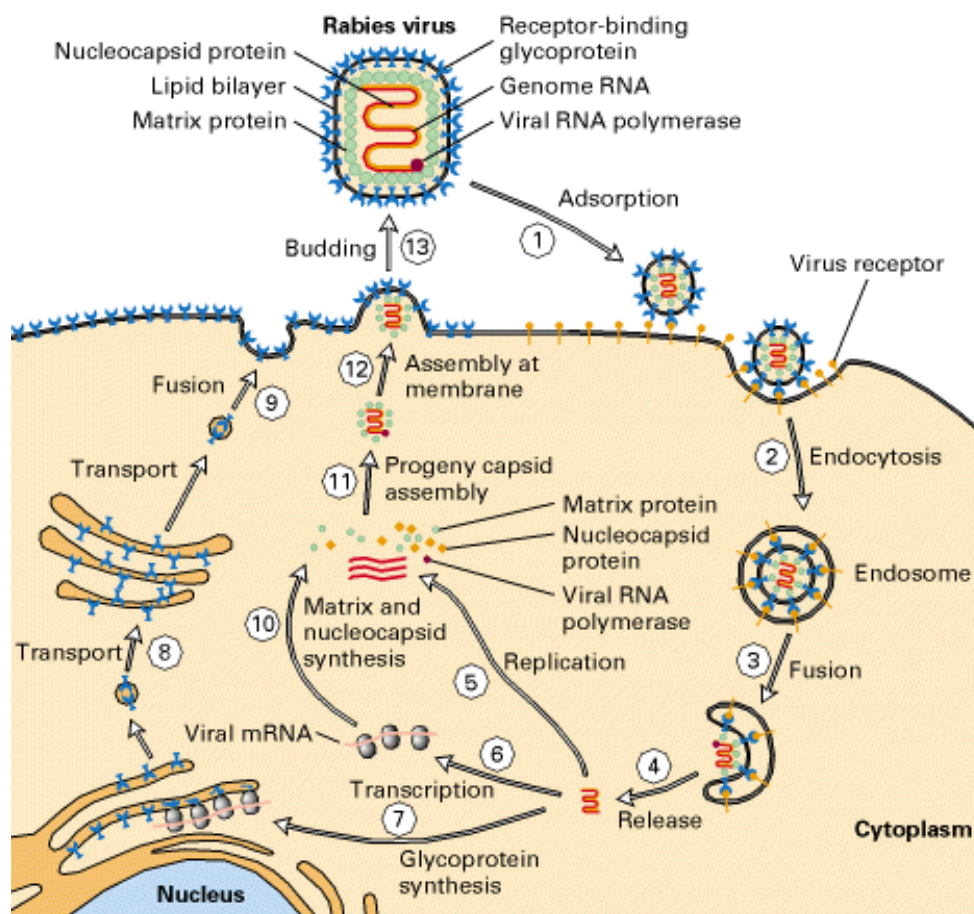


Figura 6. Ciclo de replicação do vírus da raiva.

O processo de transcrição dos mRNAs é então realizado no citoplasma pela RNA polimerase dependente de RNA do vírus, usando como molde a seqüência de polaridade negativa do genoma (Collins *et al.*, 2001). A polimerase inicia a transcrição a partir de um único promotor na extremidade 3' do genoma, chamada de região Leader, e termina em uma região análoga na extremidade 5', chamada de região Trailer (Figura 7). À medida que a polimerase percorre o genoma, sinais chamados de *gene-start* (GS) e *gene-end* (GE), localizados nas extremidades de cada gene, sinalizam, respectivamente, para o começo e o término da síntese dos mRNAs (Figura 7). Portanto, a transcrição do HRSV ocorre através de um mecanismo seqüencial no sentido 3' para 5' do genoma, produzindo 9 mRNAs subgenômicos monocistrônicos e um mRNA bicistrônico, contendo as ORFs (*Open Reading Frame*) dos genes M2-1 e M2-2 (Collins *et al.*, 2001).

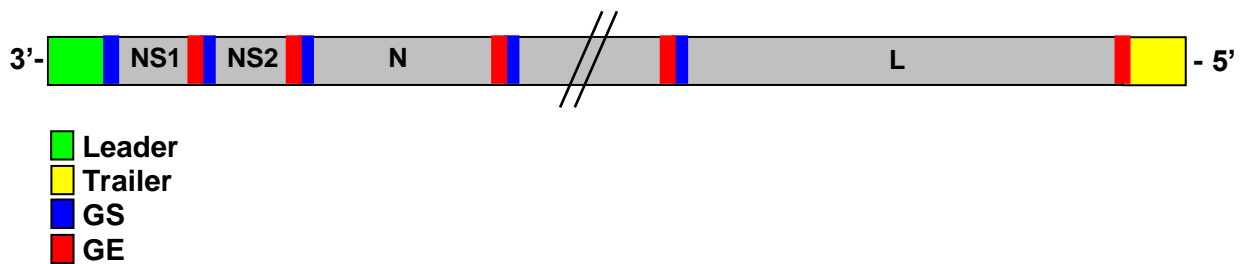


Figura 7. Organização dos elementos de replicação e transcrição do genoma do HRSV.

Estudos mostram que os genes mais próximos da região Leader são gradualmente mais transcritos que os mais distantes, determinando um tipo de controle da expressão gênica diferencial (Collins e Wertz, 1983). Acredita-se que esse gradiente de expressão seja formado devido ao fato de que a polimerase falha em realizar a transcrição seqüencial em alguns momentos, ou seja, em alguns ciclos de transcrição a polimerase se desacopla do genoma nos sinais *gene-end* e não completa as demais transcrições até o sinal Trailer. Dessa forma, os mRNAs dos genes mais próximos à região Leader são gradualmente produzidos em maior quantidade. Conseqüentemente, a quantidade de cada proteína está sujeita ao mesmo fenômeno.

Os mRNAs de proteínas do envelope que são glicosiladas, como as proteínas F e G, são traduzidos no retículo endoplasmático rugoso. As proteínas recém traduzidas são ancoradas à membrana e exportadas para a membrana citoplasmática via o complexo de Golgi. O restante dos mRNAs é traduzido no citoplasma, gerando as proteínas do nucleocapsídeo, de matriz e não estruturais (Figura 6).

Quando certo nível da síntese protéica é atingido, há uma inibição da transcrição e um estímulo da replicação do genoma. Acredita-se que essa sinalização seja dada pela proteína M2-2, já que vírus mutantes com o gene dessa proteína deletado apresentam alta transcrição do genoma, mas baixa replicação (Collins *et al.*, 2001). Durante o processo de replicação do genoma, a polimerase viral ignora os sinais *gene-end* e sintetiza cópias completas de polaridade positiva e encapsidadas do genoma, chamadas de antígenoma. Os antígenomas, por sua vez, servem de molde para a síntese de uma prole de genomas negativos. Nesse processo, a região Trailer é usada como região iniciadora e a região Leader como terminadora (Collins *et al.*, 2001).

Finalmente, os genomas de RNA negativo complexado às proteínas do nucleocapsídeo e de matriz são encaminhados à face interna da membrana citoplasmática (Figura 6). Acredita-se que o citoesqueleto, mais especificamente os filamentos de actina, estejam envolvidos nesse processo (Collins *et al.*, 2001). Além disso, a proteína M tem importante papel na montagem da partícula viral, já que ela serve de interface entre as proteínas do nucleocapsídeo, como a proteína M2-1 (Li *et al.*, 2008), e as do envelope, como a proteína G (Ghildyal *et al.*, 2005), permitindo o brotamento da partícula viral madura (Figura 4).

1.6 A Proteína N

A proteína N ou proteína do nucleocapsídeo do HRSV é composta por 391 aminoácidos, sendo altamente conservada entre os *Pneumovirus*, e apresentando 93% de similaridade com a do BRSV (Vírus Respiratório Sincicial Bovino; Barr *et al.*, 1991). Recebe esse nome por ser a principal proteína do nucleocapsídeo, interagindo com o RNA de tal maneira a formar uma estrutura ribonucleoprotéica helicoidal (Meric *et al.*, 1994; Bhella *et al.*, 2002), como mostra a Figura 5 (Murphy *et al.*, 2003). Além disso, a proteína N é responsável por garantir ao genoma e ao antígenoma do HRSV resistência a RNAses (Collins *et al.*, 2001).

A presença da proteína P é importante para que a proteína N não se ligue a RNAs celulares, ou seja, essa interação garante a especificidade do encapsidamento do RNA viral (Curran *et al.*, 1995; Spehner *et al.*, 1997). Duas regiões de interação da proteína N com a proteína P do BRSV foram identificadas através de substituições e deleções, sendo correspondentes aos aminoácidos 244 a 290 e 338 a 364 (Khattar *et al.*, 2000). No mesmo trabalho foi demonstrado que uma grande parte da proteína (aminoácidos de 1 a 364) é necessária para o encapsidamento do RNA viral (Khattar *et al.*, 2000). Já em outro trabalho,

analisando-se também uma série de mutantes da proteína N, foram identificadas três possíveis regiões de interação da proteína N com a proteína P: aminoácidos de 46 a 64, 241 a 260 e 301 a 335, sendo que a primeira delas encontra-se na região N-terminal, onde não se pensava haver interação com a proteína P (Murphy *et al.*, 2003). Além disso, a região da proteína N responsável pelo encapsidamento do RNA viral foi caracterizada entre os aminoácidos de 1 a 92 (Murphy *et al.*, 2003).

Apesar das diferenças entre esses dois estudos, podemos caracterizar dois domínios principais dentro da proteína N: a porção N-terminal parece estar mais envolvida com a formação do nucleocapsídeo e a porção C-terminal com a interação com outras proteínas, principalmente com a proteína P. Estudos com outros vírus da família *Paramyxoviridae* sugerem que há uma interação da proteína N com a proteína M, e que isso pode ser importante para a montagem do vírion (Coronel, 2001).

A estrutura terciária da proteína N do *Borna Disease Virus*, pertencente à outra família da ordem *Mononegavirales*, foi recentemente elucidada com sucesso (Rudolph *et al.*, 2003). Nesse trabalho foi feita a expressão dessa proteína em bactérias utilizando-se o sistema de fusão com a MBP (*Maltose Binding Protein*), usada para co-purificar a proteína de interesse. Mais recentemente, um grupo de pesquisadores obteve a estrutura, com resolução de 24 Å, da proteína N do HRSV complexada ao RNA (MacLellan *et al.*, 2007), como mostra a Figura 8. Para tanto, a proteína N foi expressa em células de inseto e os complexos ribonucleoproteicos, como os apresentados na Figura 5, foram purificados por gradiente de CsCl e analisados por microscopia eletrônica e comparados com a estrutura do complexo proteína N-RNA do VSV (*Vesicular Stomatitis Virus*; Green *et al.*, 2006).

1.7 A Proteína P

A proteína P ou fosfoproteína é composta por 241 aminoácidos e apresenta duas regiões conservadas correspondentes aos aminoácidos de 1 ao 58 e de 86 ao 241 (Johnson e Collins, 1990). Recebe esse nome por possuir fosforilações nas serinas localizadas nas posições 116, 117, 119, 232 e 237 (Navarro *et al.*, 1991), sendo que 80% dessas fosforilações encontram-se na posição 232 (Sanchez-Seco *et al.*, 1995). Acredita-se que essas modificações pós-traducionais sejam feitas por caseínas quinases II (CKII) celulares (Mazumder e Barik, 1994).

Estudos recentes mostram que as fosforilações nessa proteína não são essenciais para a transcrição e a replicação viral, mas o nível de fosforilação parece modular esses processos

(Villanueva *et al.*, 2000). Inicialmente, foi descrito que a proteína P expressa em bactérias não é capaz de oligomerizar e, portanto, as fosforilações poderiam ser importantes para a formação de tetrâmeros (Asenjo e Villanueva, 2000). Outro trabalho, porém, demonstrou que a proteína P expressa em bactérias é capaz de formar tetrâmeros (Castagné *et al.*, 2004), ou seja, a oligomerização ocorre independentemente das fosforilações.

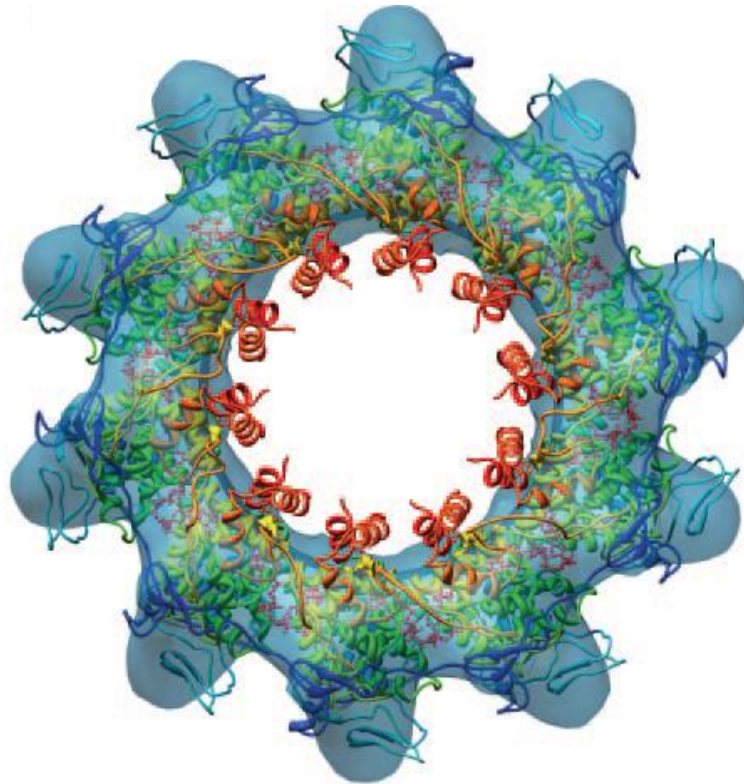


Figura 8. Estrutura de 24 Å da proteína N do HRSV complexada ao RNA obtida por microscopia eletrônica de nucleocapsídeos purificados, em vista transversal. Cada volta da hélice do nucleocapsídeo é formada por 10 moléculas da proteína N, gerando o aspecto de anel observado na Figura 5.

FONTE: MacLellan *et al.*, 2007.

A comparação da proteína P do HRSV com as de outros vírus da família *Paramyxoviridae* permite inferir algumas funções dessa proteína. Uma delas é participar na transcrição e na replicação viral como um co-fator, já que garante a estabilidade e o posicionamento da proteína L, que contém os sítios ativos da polimerase viral, no complexo RNA-proteína N (Horikami *et al.*, 1992; Bowman *et al.*, 1999). Além disso, a proteína P funciona como uma chaperona molecular para a proteína N, ou seja, garante a formação correta da estrutura da proteína N, o que é importante para que haja a especificidade do encapsidamento pelo RNA viral (Curran *et al.*, 1995; Spehner *et al.*, 1997).

Foram identificadas, através de substituições e deleções de aminoácidos, regiões de interação da proteína P com as proteínas L e N do BRSV (Khattar *et al.*, 2001). As regiões dos aminoácidos 161 a 180 e 221 a 241 são importantes para a ligação com a proteína N e a região dos aminoácidos 121 a 160 é importante para a ligação com a proteína L. O fato de ocorrer a formação de uma grande quantidade de alfa-hélices na região dos aminoácidos 100 a 241 (Lupas *et al.*, 1991), juntamente com os dados de regiões conservadas na proteína P (Johnson e Collins, 1990), parecem corroborar a conclusão de que existe um pequeno domínio N-terminal e um grande domínio C-terminal, separados por uma região pouco conservada (aminoácidos 59 a 85). Além disso, trabalhos recentes caracterizaram estruturalmente a região dos aminoácidos 104 ao 161 da proteína P do HRSV por conter alfa-hélices e ser o domínio responsável pela oligomerização da proteína, como mostra a Figura 9 (Llorente *et al.*, 2006; Llorente *et al.*, 2008).

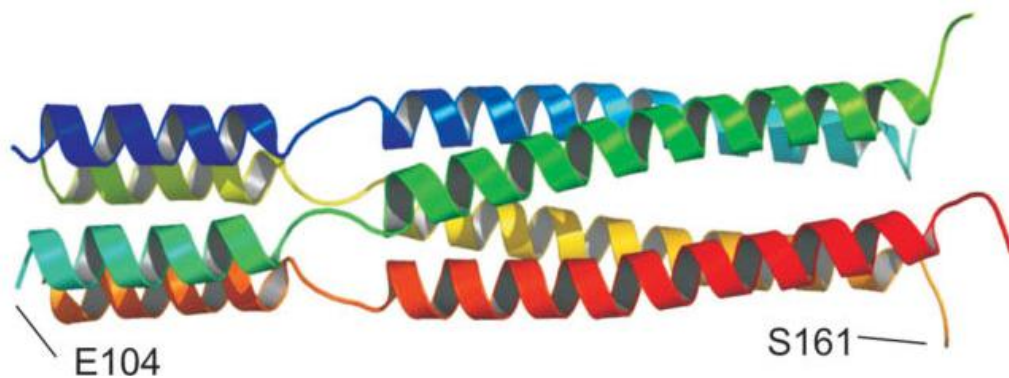


Figura 9. Estrutura do domínio de oligomerização compreendido entre os aminoácidos 104 a 161 da proteína P do HRSV. São mostrados 4 domínios em diferentes cores interagindo e formando tetrâmeros.

FONTE: Llorente *et al.*, 2008

Por fim, outra possível função dada às proteínas N e P é de interagir com uma proteína celular chamada profilina, envolvida na formação dos filamentos de actina do citoesqueleto (Bitko *et al.*, 2003). Segundo os autores, essas interações permitiriam que o complexo ribonucleoproteico se deslocasse para a membrana celular, onde estariam as proteínas de envelope do vírus, participando assim do processo de formação da partícula viral.

1.8 Domínios desordenados

Proteínas desordenadas são proteínas que não apresentam estrutura secundária e terciária sob condições fisiológicas e na ausência de ligantes naturais (Dunker *et al.*, 2001;

Ferron *et al.*, 2006). Uma série de propriedades é dada a uma proteína contendo domínios desordenados, tais como: interagir com mais de uma proteína; possuir alta especificidade, mas baixa afinidade na interação; ser alvo fácil de modificações pós-traducionais e de proteases; ter a função preservada mesmo em pHs extremos e temperaturas elevadas; e ter a presença de aminoácidos carregados e ausência de aminoácidos hidrofóbicos (Ferron *et al.*, 2006).

As proteínas N e P de vários membros da subfamília *Paramyxoviridae* (vírus do sarampo, Sendai e Parainfluenza Humano 2) foram caracterizadas como contendo domínios desordenados (Karlin *et al.*, 2003). Um modelo foi recentemente proposto para o vírus do sarampo onde o processo de replicação é explicado segundo a flexibilidade dada pelos domínios desordenados (Bourhis *et al.*, 2006). Nesse modelo, o N-terminal desordenado da proteína P interage com proteínas N recém sintetizadas pelo ribossomo e realiza o direcionamento das mesmas para o RNA viral, sintetizado pela proteína L.

1.9 Tratamento e Desenvolvimento de Vacinas contra o HRSV

Atualmente, a forma de tratamento mais efetiva da infecção pelo HRSV é o uso de um anticorpo monoclonal contra a proteína F, humanizado, chamado Palivizumab (Synagis[®]), que inibe a entrada do vírus na célula (Sidwell e Barnard, 2006). Porém, vários estudos mostram que o custo do Palivizumab é muito alto em relação aos benefícios que ele gera, limitando seu uso em larga escala (Joffe *et al.*, 1999).

A ribavirina, usada no tratamento de outros vírus como o Influenza, também é usada no controle da infecção pelo HRSV. A ribavirina é um análogo de nucleotídeo que inibe a replicação do vírus ao ser incorporada ao RNA viral, causando mutações letais. Apesar de apresentar alguma eficiência, a ribavirina causa efeitos colaterais, tornando seu uso limitado (Sidwell e Barnard, 2006).

Desde a descoberta do HRSV procura-se uma vacina eficiente, e na década de 60 foram feitos testes clínicos com a primeira delas, utilizando-se vírus inativados com formalina. Embora muitas crianças que receberam a vacina tenham produzido anticorpos neutralizantes específicos, elas não ficaram protegidas contra a infecção natural e ainda desenvolveram uma doença mais severa quando infectadas com o vírus selvagem, havendo alguns casos de morte (Fulginiti *et al.*, 1969; Kim *et al.*, 1969). A análise do tecido pulmonar dessas crianças revelou extensiva infiltração de células mononucleares e eosinofilia (Fulginiti *et al.*, 1969; Kim *et al.*, 1969).

Desde então, um grande esforço tem sido feito para entender a resposta imune contra o HRSV e desenvolver novas formas de vacina que levem a uma imunização sem a hiperreatividade apresentada nos primeiros testes clínicos. Dentre as novas formulações vacinais, foram testadas, em modelos animais: vírus mutantes sensíveis à temperatura, vírus vaccínia recombinantes expressando proteínas do HRSV, peptídeos com epítomos protetores e vetores de DNA expressando as proteínas virais (Dudas e Karron, 1998). Apesar disso, ainda não existe nenhuma vacina definida para uso em humanos.

Mais recentemente, vacinas de DNA foram testadas em bezerros (Taylor *et al.*, 2005) e em chimpanzés (Vaughan *et al.*, 2005), contra a proteína F do BRSV e as proteínas F e N do HRSV, respectivamente. Ambos os trabalhos detectaram, após imunização com DNA, níveis razoáveis de IgG contra os vírus, resposta imune celular e proteção contra o HRSV, observada pela diminuição de infiltrados pulmonares nos grupos imunizados.

1.10 Resposta imune contra o HRSV

O desenvolvimento de um quadro clínico mais severo com a administração do vírus inativado com formalina gerou uma demanda no estudo das relações do HRSV com o sistema imune. Uma série de dados aponta que o HRSV produz uma forma solúvel da proteína G durante a infecção e que essa proteína estimula a liberação de uma série de citocinas, tais como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, envolvidas na resposta do tipo Th2 (Becker, 2006). Dessa forma, o vírus causa um desvio da resposta imune para o tipo Th2, um processo similar ao causado por agentes alergênicos (Becker, 2006). Comprovando essa teoria, o uso de um epítomo indutor de resposta imune celular da proteína M2, fusionado à proteína G e expresso por um vírus vaccínia recombinante, foi capaz de reduzir o desvio da resposta imune para Th2, estimulando um grande número de células T CD8 e gerando proteção contra o HRSV em camundongos (Zeng *et al.*, 2006; Olson e Varga, 2007).

Outro aspecto interessante da infecção pelo HRSV é que não há proteção natural contra re-infecções, ou seja, o vírus é capaz de evadir os sistemas de defesa do organismo. Um mecanismo importante para esse processo é a inibição da resposta por IFN (interferon) do tipo I, responsável por gerar um estado antiviral na célula e um dos principais mecanismos de resposta inata do organismo. Foi demonstrado que a proteína NS2 é capaz de inibir a cascata de sinalização JAK-STAT, impedindo a indução de IFN (Spann *et al.*, 2004; Kotelkin *et al.*, 2006).

Uma série de outros mecanismos, revisados por Collins e Graham (2008), são atribuídos à infecção do HRSV para explicar a evasão do sistema imune, tais como: diversidade na seqüência da proteína G, um dos principais antígenos protetores; interferência nas funções dos macrófagos e das células dendríticas, como inibição da maturação destas últimas pelas proteínas NS1 e NS2; tropismo pelas células da superfície do lúmen pulmonar, onde a eficiência do sistema imune é menor; inibição da apoptose por uma série de proteínas virais, como NS1, NS2 e SH; e apesar de ser altamente infeccioso, o vírus é pouco invasivo.

1.11 Otimização da expressão das proteínas do HRSV em células humanas

O sistema de expressão classicamente usado para a expressão das proteínas do HRSV é o sistema da T7 RNA polimerase, onde os genes são clonados sob o controle do promotor dessa polimerase proveniente do bacteriófago T7 (Grosfeld *et al.*, 1995). Dessa forma, a transcrição dos mRNAs se dá no citoplasma e é dependente da co-expressão da T7 RNA polimerase, seja por um vetor de DNA ou um vírus vaccinia recombinante (Yunus *et al.*, 1998).

Recentemente, um trabalho demonstrou que os genes do HRSV somente são transcritos em níveis elevados através de um promotor nuclear da RNA polimerase II celular, como o promotor *immediate early* do CMV (Citomegalovirus), se os genes forem otimizados (Ternette *et al.*, 2007a). Mais especificamente, o trabalho demonstra que sinais de poliadenilação prematuros, como a seqüência consenso AATAAA, estão presentes no gene F do HRSV, os quais geram formas truncadas de mRNAs, impedindo a expressão eficiente da proteína F por um promotor da RNA polimerase II.

O processo de otimização envolve uma série de melhorias e modificações da seqüência de nucleotídeos dos genes, mas que não alteram a seqüência de aminoácidos codificada pelos genes. Dentre as alterações podemos citar: o uso dos códons é adaptado ao da célula; sinais de *splicing* e poliadenilação pré-maturos são removidos; o conteúdo GC é adaptado ao do genoma celular; seqüências repetitivas são eliminadas; e a estrutura secundária do RNA é modificada para minimizar pareamento intramolecular. Naturalmente, durante a infecção viral, os mRNAs do HRSV são transcritos no citoplasma e, portanto, a presença desses sinais nos genes do vírus não interfere na expressão de suas proteínas.

Em um trabalho mais recente, o mesmo grupo demonstrou que a otimização do gene F, sob o controle de um promotor CMV, levou a melhores resultados de imunização, ou seja, gerou mais anticorpos quando comparado com o mesmo vetor carregando o gene F selvagem

(Ternette *et al.*, 2007b). Por fim, outro grupo demonstrou recentemente que a otimização dos genes F e N do BRSV leva à indução de uma forte resposta imune celular e proteção contra o vírus (Boxus *et al.*, 2007).

1.12 O Sistema Minigenoma

Um Minigenoma nada mais é do que o genoma do vírus contendo os elementos *cis* de regulação da transcrição e da replicação, porém, com os genes virais parcialmente ou totalmente deletados. No lugar desses genes, é colocado um gene heterólogo, que pode ser um gene repórter usado para facilitar a caracterização da funcionalidade do sistema, ou um gene de interesse qualquer usado para outros fins. O sistema Minigenoma funciona apenas se as proteínas de replicação e transcrição do vírus estiverem disponíveis em *trans*, seja através do próprio vírus selvagem, ou através de sistemas recombinantes, como plasmídeos ou vetores virais. Além do estudo da própria replicação e transcrição do genoma viral, assim como das proteínas envolvidas nesses processos, um sistema Minigenoma permite a geração de vetores recombinantes ou quimeras virais carregando genes heterólogos que podem ser usados em terapias genéticas ou vacinais.

A técnica de Minigenoma para o HRSV, originalmente descrita por Collins *et al.* (1991), tem permitido o estudo de interações das proteínas virais N, P e L, envolvidas no processo replicativo assim como o próprio processo de replicação, utilizando o gene CAT (cloramfenicol acetiltransferase) como gene repórter. Nesse caso, o gene CAT é clonado em um cassete de expressão típico do HRSV, ou seja, contendo a região Leader, o sinal GS, o gene repórter, o sinal GE e a região Trailer (Figura 10). Dessa forma, células transfectadas com quatro plasmídeos distintos, expressando as proteínas N, P, L e o Minigenoma, são capazes de expressar o gene repórter (Grosfeld *et al.*, 1995). Em todos os plasmídeos os genes e o Minigenoma são colocados sob o controle do promotor da T7 RNA Polimerase, que pode ser expressa na célula por um vírus vaccínia recombinante (Yunus *et al.*, 1998). Além disso, é necessária a inserção de uma Ribozima a 3' da região Leader, para que esta seja exposta através da excisão do RNA excedente presente na extremidade 3' (Grosfeld *et al.*, 1995). Foi demonstrado que a exposição da extremidade 3' da região Leader é importante para que haja o seu reconhecimento pela proteína L (Cowton e Fearn, 2005).

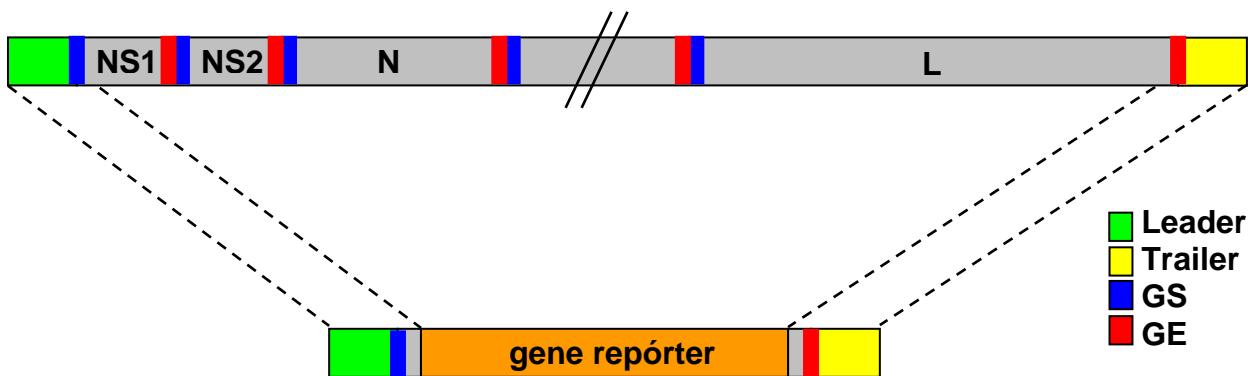


Figura 10. Esquema mostrando como é derivado um Minigenoma a partir do genoma do HRSV.

Apesar de ter sido bastante usado até hoje, o Minigenoma do HRSV nunca foi testado de outra forma, como por exemplo, através da expressão usando-se outro promotor além do T7. A troca por um promotor eucarioto teria a vantagem do sistema não necessitar mais da infecção com o vaccinia recombinante expressando a T7 RNA polimerase. Trabalhos relatam o uso do promotor da RNA polimerase I eucariota no desenvolvimento de Minigenomas para o vírus Influenza (Neumann *et al.*, 1999) e para o vírus Uukuniemi, membro da família *Bunyaviridae* (Flick e Pettersson, 2001), ambos com genoma de RNA negativo segmentado.

A aplicação mais direta do Minigenoma é o desenvolvimento de vetores virais, como foi feito com o vírus Sendai (Li *et al.*, 2000), também pertence à família *Paramyxoviridae*. Nesse trabalho, o genoma do vírus contendo o gene F deletado foi replicado da mesma forma que os Minigenomas do HRSV, ou seja, transfectando-se plasmídeos que expressam, através do sistema da T7 RNA polimerase, as proteínas do complexo de replicação. Em seguida, esse genoma, que é encapsidado, é purificado e inserido em células empacotadoras expressando a proteína F, gerando dessa forma partículas infecciosas mas deficientes em replicação, capazes de inserir genes exógenos em células-alvo. Esse sistema foi usado para gerar vetores Sendai expressando a proteína Gag do HIV, os quais foram usados com sucesso em testes de imunização contra esse vírus (Takeda *et al.*, 2003).

6 CONCLUSÕES

Expressão em bactérias e purificação das proteínas N e P do HRSV: estudos estruturais e funcionais:

- 1) As proteínas MBP-N e MBP-P foram expressas, purificadas e foram usadas para produzir, em camundongos, anticorpos contra as proteínas N e P do HRSV.
- 2) A digestão com enteroquinase da MBP-N foi incompleta, resultando em grande quantidade de proteína não digerida mesmo quando grande quantidade de enzima foi adicionada. A troca do sítio de protease deverá ser avaliada.
- 3) A digestão com enteroquinase da MBP-P causou um fenômeno de degradação da proteína P, o qual foi relacionado à presença de regiões desordenadas na proteína.
- 4) A proteína P foi caracterizada, por diferentes métodos *in silico* e pela identificação de regiões hipersensíveis a proteases, como contendo dois domínios desordenados: um N-terminal (aminoácidos de 1 a 40) e outro C-terminal (aminoácidos 230 a 241).

Expressão em células humanas das proteínas N e P e testes de imunização em camundongos utilizando genes otimizados:

- 5) As proteínas N e P somente foram expressas por um promotor da RNA polimerase II eucariota após a otimização de seus respectivos genes.
- 6) Os genes N e P otimizados foram usados como vacinas de DNA, sendo capazes de gerar forte resposta imune humoral em camundongos.
- 7) Os genes N e P otimizados foram capazes de gerar maior resposta imune celular quando comparados ao grupo controle, que apresentou, no entanto, níveis elevados de IFN- γ .

Estudos de interação das proteínas N e P do HRSV com proteínas celulares humanas:

- 8) A proteína HSP70 foi co-immunoprecipitada com a proteína P em células humanas, indicando que a proteína P é a mediadora da interação entre a HSP70 e o complexo de replicação do HRSV.
- 9) As proteínas PRMT5 e MEP50 do metilossomo e a NPM, que interage com rRNA, foram co-immunoprecipitadas com a proteína N, mas uma melhor caracterização dessas interações é necessária.

Desenvolvimento de um sistema Minigenoma alternativo para o HRSV:

10) O sistema Minigenoma do HRSV sob controle de um promotor da RNA polimerase II foi construído com sucesso mas apresentou pouca atividade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Asenjo A, Villanueva N. Regulated but not constitutive human respiratory syncytial virus (HRSV) P protein phosphorylation is essential for oligomerization. *FEBS Lett.* 2000 Feb 11;467(2-3):279-84.

Auewarakul P. Composition bias and genome polarity of RNA viruses. *Virus Res.* 2005 Apr;109(1):33-7.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology.* New York: John Wiley & Sons; 1994.

Barr J, Chambers P, Pringle CR, Easton AJ. Sequence of the major nucleocapsid protein gene of pneumonia virus of mice: sequence comparisons suggest structural homology between nucleocapsid proteins of pneumoviruses, paramyxoviruses, rhabdoviruses and filoviruses. *J Gen Virol.* 1991 Mar;72 (Pt 3):677-85.

Bártová E, Krejčí J, Harnicarová A, Galiová G, Kozubek S. Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem.* 2008 Aug;56(8):711-21.

Becker Y. Respiratory syncytial virus (RSV) evades the human adaptive immune system by skewing the Th1/Th2 cytokine balance toward increased levels of Th2 cytokines and IgE, markers of allergy - a review. *Virus Genes.* 2006 Oct;33(2):235-52.

Bhella D, Ralph A, Murphy LB, Yeo RP. Significant differences in nucleocapsid morphology within the Paramyxoviridae. *J Gen Virol.* 2002 Aug;83(Pt 8):1831-9.

Bitko V, Oldenburg A, Garmon NE, Barik S. Profilin is required for viral morphogenesis, syncytium formation, and cell-specific stress fiber induction by respiratory syncytial virus. *BMC Microbiol.* 2003 May 9;3:9.

Blount RE, Morris JA, Savage RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1956 Jul;92(3):544-9.

Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ. *Protein Methods.* 2. ed. New York: Wiley-liss; 1996.

Bourhis JM, Canard B, Longhi S. Structural disorder within the replicative complex of measles virus: functional implications. *Virology.* 2006 Jan 5;344(1):94-110.

Bowman MC, Smallwood S, Moyer SA. Dissection of individual functions of the Sendai virus phosphoprotein in transcription. *J Virol.* 1999 Aug;73(8):6474-83.

*De acordo com:

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

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.

Brown G, Rixon HW, Steel J, McDonald TP, Pitt AR, Graham S, Sugrue RJ. Evidence for an association between heat shock protein 70 and the respiratory syncytial virus polymerase complex within lipid-raft membranes during virus infection. *Virology.* 2005 Jul 20;338(1):69-80.

Callebaut I, Labesse G, Durand P, Poupon A, Canard L, Chomilier J, Henrissat B, Mornon JP. Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives. *Cell Mol Life Sci.* 1997 Aug;53(8):621-45.

Carromeu C, Simabuco FM, Tamura RE, Farinha Arcieri LE, Ventura AM. Intracellular localization of human respiratory syncytial virus L protein. *Arch Virol.* 2007;152(12):2259-63.

Castagné N, Barbier A, Bernard J, Rezaei H, Huet JC, Henry C, Da Costa B, Eléouët JF. Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain. *J Gen Virol.* 2004 Jun;85(Pt 6):1643-53.

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. *Am J Hyg.* 1957 Nov;66(3):281-90.

Coates HV, Alling DW, Chanock RM. An antigenic analysis of respiratory syncytial virus isolates by a plaque reduction neutralization test. *Am J Epidemiol.* 1966 Mar;83(2):299-313.

Collins PL, Wertz GW. cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80:3208-12.

Collins PL, Mink MA, Stec DS. Rescue of synthetic analogs of respiratory syncytial virus genomic RNA and effect of truncations and mutations on the expression of a foreign reporter gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Nov 1;88(21):9663-7.

Collins PL, Chanock RM, Murphy BR. Respiratory Syncytial Virus. In: Fields BN, Knipe DM, Roizman B, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Howley PM, Stratus SE. *Fields Virology*. 4. ed. Philadelphia: Lippincott – Raven Publishers; 2001.

Collins PL, Graham BS. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J Virol*. 2008 Mar;82(5):2040-55.

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.

Cowton VM, Fearn R. Evidence that the respiratory syncytial virus polymerase is recruited to nucleotides 1 to 11 at the 3' end of the nucleocapsid and can scan to access internal signals. *Virology* 2005 Sep;79(17):11311-22.

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.

Dudas RA, Karron RA. Respiratory syncytial virus vaccines. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Jul;11(3):430-9.

Dunker AK, Lawson JD, Brown CJ, Williams RM, Romero P, Oh JS, Oldfield CJ, Campen AM, Ratliff CM, Hipps KW, Ausio J, Nissen MS, Reeves R, Kang C, Kissinger CR, Bailey RW, Griswold MD, Chiu W, Garner EC, Obradovic Z. Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model*. 2001;19(1):26-59.

Durigon EL, Takahashi VNO, Soares PBM, Motosso VF. Vírus sincicial humano: Revisão e levantamento dos dados brasileiros. São Paulo: Divisão Hospitalar dos Laboratórios ABBOTT; 1999.

Falsey AR, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Jul;13(3):371-84.

Feldman SA, Hendry RM, Beeler JA. Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. *J Virol*. 1999 Aug;73(8):6610-7.

Ferron F, Longhi S, Canard B, Karlin D. A practical overview of protein disorder prediction methods. *Proteins*. 2006 Oct 1;65(1):1-14.

Flick R, Pettersson RF. Reverse genetics system for Uukuniemi virus (Bunyaviridae): RNA polymerase I-catalyzed expression of chimeric viral RNAs. *J Virol*. 2001 Feb;75(4):1643-55.

Friesen WJ, Wyce A, Paushkin S, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins. *J Biol Chem.* 2002 Mar 8;277(10):8243-7.

Fulginiti VA, Eller JJ, Sieber OF, Joyner JW, Minamitani M, Meiklejohn G. Respiratory virus immunization. I. A field trial of two inactivated respiratory virus vaccines; an aqueous trivalent parainfluenza virus vaccine and an alum-precipitated respiratory syncytial virus vaccine. *Am J Epidemiol.* 1969 Apr;89(4):435-48.

Gaboriaud C, Bissery V, Benchetrit T, Mornon JP. Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. *FEBS Lett.* 1987 Nov 16;224(1):149-55.

García J, García-Barreno B, Vivo A, Melero JA. 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.* 1993 Jul;195(1):243-7.

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.* 2005 Jul;86(Pt 7):1879-84.

Green TJ, Zhang X, Wertz GW, Luo M. Structure of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein-RNA complex. *Science.* 2006 Jul 21;313(5785):357-60.

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.

Haag Breese E, Uversky VN, Georgiadis MM, Harrington MA. The disordered amino-terminus of SIMPL interacts with members of the 70-kDa heat-shock protein family. *DNA Cell Biol.* 2006 Dec;25(12):704-14.

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 10;315(2):77-81.

Han LL, Alexander JP, Anderson LJ. Respiratory syncytial virus pneumonia among the elderly: an assessment of disease burden. *J Infect Dis.* 1999 Jan;179(1):25-30.

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

Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD, Ray CG, Taussig LM, Lebowitz MD. Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses in the first year of life. *Am J Epidemiol.* 1991 Jun 1;133(11):1135-51.

Horikami SM, Curran J, Kolakofsky D, Moyer SA. Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro. *J Virol.* 1992 Aug;66(8):4901-8.

Jansen RP. mRNA localization: message on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Apr;2(4):247-56.

Jenkins GM, Holmes EC. The extent of codon usage bias in human RNA viruses and its evolutionary origin. *Virus Res.* 2003 Mar;92(1):1-7.

Joffe S, Ray GT, Escobar GJ, Black SB, Lieu TA. Cost-effectiveness of respiratory syncytial virus prophylaxis among preterm infants. *Pediatrics.* 1999 Sep;104(3 Pt 1):419-27.

Johnson PR, Collins PL. Sequence comparison of the phosphoprotein mRNAs of antigenic subgroups A and B of human respiratory syncytial virus identifies a highly divergent domain in the predicted protein. *J Gen Virol.* 1990 Feb;71 (Pt 2):481-5.

Karlin D, Ferron F, Canard B, Longhi S. Structural disorder and modular organization in Paramyxovirinae N and P. *J Gen Virol.* 2003 Dec;84(Pt 12):3239-52.

Khattar SK, Yunus AS, Collins PL, Samal SK. Mutational analysis of the bovine respiratory syncytial virus nucleocapsid protein using a minigenome system: mutations that affect encapsidation, RNA synthesis, and interaction with the phosphoprotein. *Virology.* 2000 Apr 25;270(1):215-28.

Khattar SK, Yunus AS, Collins PL, Samal SK. Deletion and substitution analysis defines regions and residues within the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus that affect transcription, RNA replication, and interaction with the nucleoprotein. *Virology.* 2001 Jul 5;285(2):253-69.

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.

Kotelkin A, Belyakov IM, Yang L, Berzofsky JA, Collins PL, Bukreyev A. The NS2 protein of human respiratory syncytial virus suppresses the cytotoxic T-cell response as a consequence of suppressing the type I interferon response. *J Virol.* 2006 Jun;80(12):5958-67. Erratum in: *J Virol.* 2006 Oct;80(20):10286.

Lemanske RF. Viral infections and asthma inception. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Nov;114(5):1023-6.

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 HO, Zhu YF, Asakawa M, Kuma H, Hirata T, Ueda Y, Lee YS, Fukumura M, Iida A, Kato A, Nagai Y, Hasegawa M. A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. *J Virol*. 2000 Jul;74(14):6564-9.

Li Z, Srivastava P. Heat-shock proteins. *Curr Protoc Immunol*. 2004 Feb;Appendix 1:Appendix 1T.

Llorente MT, García-Barreno B, Calero M, Camafeita E, López JA, Longhi S, Ferrón F, Varela PF, Melero JA. Structural analysis of the human respiratory syncytial virus phosphoprotein: characterization of an alpha-helical domain involved in oligomerization. *J Gen Virol*. 2006 Jan;87(Pt 1):159-69.

Llorente MT, Taylor IA, López-Viñas E, Gomez-Puertas P, Calder LJ, García-Barreno B, Melero JA. 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*. 2008 Aug 15;72(3):946-58.

Lupas A, Van Dyke M, Stock J. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*. 1991 May 24;252(5009):1162-1164.

Mavrakis M, McCarthy AA, Roche S, Blondel D, Ruigrok RW. Structure and function of the C-terminal domain of the polymerase cofactor of rabies virus. *J Mol Biol*. 2004 Oct 29;343(4):819-31.

Mazumder B, Barik S. Requirement of casein kinase II-mediated phosphorylation for the transcriptional activity of human respiratory syncytial viral phosphoprotein P: transdominant negative phenotype of phosphorylation-defective P mutants. *Virology*. 1994 Nov 15;205(1):104-11. Erratum in: *Virology* 1995 May 10;209(1):284.

Méric C, Spehner D, Mazarin V. Respiratory syncytial virus nucleocapsid protein (N) expressed in insect cells forms nucleocapsid-like structures. *Virus Res*. 1994 Feb;31(2):187-201.

Murphy LB, Loney C, Murray J, Bhella D, Ashton P, Yeo RP. Investigations into the amino-terminal domain of the respiratory syncytial virus nucleocapsid protein reveal elements important for nucleocapsid formation and interaction with the phosphoprotein. *Virology*. 2003 Mar 1;307(1):143-53.

Navarro J, López-Otín C, Villanueva N. Location of phosphorylated residues in human respiratory syncytial virus phosphoprotein. *J Gen Virol*. 1991 Jun;72 (Pt 6):1455-9.

Neumann G, Watanabe T, Ito H, Watanabe S, Goto H, Gao P, Hughes M, Perez DR, Donis R, Hoffmann E, Hobom G, Kawaoka Y. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 3;96(16):9345-50.

Okuwaki M. The structure and functions of NPM1/Nucleophsmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein. *J Biochem*. 2008 Apr;143(4):441-8.

Olson MR, Varga SM. CD8 T cells inhibit respiratory syncytial virus (RSV) vaccine-enhanced disease. *J Immunol*. 2007 Oct 15;179(8):5415-24.

Örvell C, Norrby E, Mufson MA. Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against five structural components of human respiratory syncytial virus subgroup B. *J Gen Virol*. 1987 Dec;68 (Pt 12):3125-35.

Roberts SR, Compans RW, Wertz GW. Respiratory syncytial virus matures at the apical surfaces of polarized epithelial cells. *J Virol*. 1995 Apr;69(4):2667-73.

Rudolph MG, Kraus I, Dickmanns A, Eickmann M, Garten W, Ficner R. Crystal structure of the borna disease virus nucleoprotein. *Structure*. 2003 Oct;11(10):1219-26.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniats T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Sánchez-Seco MP, Navarro J, Martínez R, Villanueva N. C-terminal phosphorylation of human respiratory syncytial virus P protein occurs mainly at serine residue 232. *J Gen Virol*. 1995 Feb;76 (Pt 2):425-30.

Schmidt AC, Johnson TR, Openshaw PJ, Braciale TJ, Falsey AR, Anderson LJ, Wertz GW, Groothuis JR, Prince GA, Melero JA, Graham BS. Respiratory syncytial virus and other pneumoviruses: a review of the international symposium--RSV 2003. *Virus Res*. 2004 Nov;106(1):1-13.

Sidwell RW, Barnard DL. Respiratory syncytial virus infections: recent prospects for control. *Antiviral Res*. 2006 Sep;71(2-3):379-90.

Simabuco FM, Carromeu C, Farinha-Arcieri LE, Tamura RE, Ventura AM. Production of polyclonal antibodies against the human respiratory syncytial virus nucleoprotein and phosphoprotein expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2007 May;53(1):209-15.

Spann KM, Tran KC, Chi B, Rabin RL, Collins PL. Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]. *J Virol*. 2004 Apr;78(8):4363-9. Erratum in: *J Virol*. 2005 Jun;78(12):6705.

Spehner D, Drillien R, Howley PM. The assembly of the measles virus nucleoprotein into nucleocapsid-like particles is modulated by the phosphoprotein. *Virology*. 1997 Jun 9;232(2):260-8.

Sullender WM. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Jan;13(1):1-15, table of contents.

Takeda A, Igarashi H, Nakamura H, Kano M, Iida A, Hirata T, Hasegawa M, Nagai Y, Matano T. Protective efficacy of an AIDS vaccine, a single DNA priming followed by a single booster with a recombinant replication-defective Sendai virus vector, in a macaque AIDS model. *J Virol*. 2003 Sep;77(17):9710-5.

Taylor G, Bruce C, Barbet AF, Wyld SG, Thomas LH. DNA vaccination against respiratory syncytial virus in young calves. *Vaccine*. 2005 Jan 26;23(10):1242-50.

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*. 2007 Jun 5;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*. 2007 Oct 10;25(41):7271-9.

Terrosi C, Di Genova G, Savellini GG, Correale P, Bardi P, Cusi MG. Immunological characterization of respiratory syncytial virus N protein epitopes recognized by human cytotoxic T lymphocytes. *Viral Immunol*. 2007 Sep;20(3):399-406.

Thorburn K, Harigopal S, Reddy V, Taylor N, van Saene HK. High incidence of pulmonary bacterial co-infection in children with severe respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. *Thorax*. 2006 Jul;61(7):611-5.

Tropea JE, Cherry S, Waugh DS. Expression and Purification of Soluble His(6)-Tagged TEV Protease. *Methods Mol Biol*. 2009;498:297-307.

Ulmer JB, DeWitt CM, Chastain M, Friedman A, Donnelly JJ, McClements WL, Caulfield MJ, Bohannon KE, Volkin DB, Evans RK. Enhancement of DNA vaccine potency using conventional aluminum adjuvants. *Vaccine*. 1999 Aug 20;18(1-2):18-28.

Vaughan K, Rhodes GH, Gershwin LJ. DNA immunization against respiratory syncytial virus (RSV) in infant rhesus monkeys. *Vaccine*. 2005 Apr 22;23(22):2928-42.

Ventura AM, Meneghini R. Inhibition and recovery of the rate of DNA synthesis in V79 Chinese hamster cells following ultraviolet light irradiation. Variation in the rate of movement of the replication fork. *Mutat Res.* 1984 Feb;131(2):81-8.

Vieira SE, Stewien KE, Queiroz DAO, Durigon EL, Török TJ, Anderson LJ, Miyao CR, Hein N, Botosso VF, Pahl MM, Gilio AE, Ejzenberg B, Okay Y. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2001; 43(3):125-31.

Villanueva N, Hardy R, Asenjo A, Yu Q, Wertz G. The bulk of the phosphorylation of human respiratory syncytial virus phosphoprotein is not essential but modulates viral RNA transcription and replication. *J Gen Virol.* 2000 Jan;81(Pt 1):129-33.

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.

Yunus AS, Collins PL, Samal SK. Sequence analysis of a functional polymerase (L) gene of bovine respiratory syncytial virus: determination of minimal trans-acting requirements for RNA replication. *J Gen Virol.* 1998 Sep;79 (Pt 9):2231-8.

Zambon M. Active and passive immunisation against respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol.* 1999 Oct-Dec;9(4):227-36.

Zeng RH, Gong W, Fan CF, Wang YF, Mei XG. Induction of balanced immunity in BALB/c mice by vaccination with a recombinant fusion protein containing a respiratory syncytial virus G protein fragment and a CTL epitope. *Vaccine.* 2006 Feb 13;24(7):941-7.

Zhang X, Glendening C, Linke H, Parks CL, Brooks C, Udem SA, Oglesbee M. Identification and characterization of a regulatory domain on the carboxyl terminus of the measles virus nucleocapsid protein. *J Virol.* 2002 Sep;76(17):8737-46.

Referências disponíveis em meio eletrônico:

Department of Pediatrics, University of North Carolina, USA. Disponível em: <http://pediatrics.med.unc.edu/div/infectdi/pcd/acquired.htm> [2002 Fev].

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/> [2008 Nov 20].

National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [2008 Nov 20].

Pneumovirus Laboratory, Warwick University, UK. Disponível em: <http://template.bio.warwick.ac.uk/staff/easton/> [2002 Fev].