

Regulation of Host Cell Signaling Pathways by Respiratory Syncytial Virus Nonstructural Protein NS1 and NS2

Han-Bo Shin, Myung-Soo Choi, Chae-Min Yi, Ji-Eun Kim, Su-Ji Jo,
Hye-In Kim, Na-Rae Lee and Kyung-Soo Inn*

Department of Pharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul, Korea

Human Respiratory Syncytial virus (hRSV) is a leading cause of severe lower respiratory tract diseases in the pediatric population. hRSV frequently causes severe morbidity and mortality in high risk groups including infants with congenital heart disease and the immunosuppressed patients. Although hRSV is recognized as a major public health threat and economic burden worldwide, there is no licensed vaccine and effective therapeutic agent. Viral nonstructural (NS) proteins have been known to play multiple functions for efficient viral replication and pathogenesis. Especially, diverse functions of influenza A virus NS1 have been extensively studied. Recent studies demonstrated that NS1 and NS2 of RSV also exert diverse functions to modulate cellular environment and antiviral immune responses. Since NS proteins of RSV are required for efficient replication and pathogenesis, NS mutant viruses have been tested as live-attenuated vaccines. This review will outline the recent progress in understanding the various functions of RSV NS1 and NS2.

Key Words: Respiratory syncytial virus, NS1, NS2, Interferon

호흡기 융합 바이러스(Respiratory syncytial virus: RSV)는 파라믹소비리데(paramyxoviridae)에 속하며 단일가닥 RNA (non-segmented negative sense RNA)를 게놈으로 가지는 바이러스이다. 호흡기를 통해 감염이 이루어지며 급성 하기도 감염을 유발하는 주요 원인체로 기관지염 및 폐렴 등을 유발한다. 전세계적으로 소아 호흡기 감염의 가장 중요한 원인체로 영유아에서는 높은 수준의 유행률과 사망률을 나타낸다 (1). 영유아의 경우 1세 이전에 68.8% 정도가 감염을 경험하며 2세까지는 82.6%가 감염을 겪는 것으로 보고되었다 (2). 생후 6개월 미만 영아를 대상으로 한 조사에서는 1,000명당 17명이 RSV 감염으로 인한 입원을 겪는 것으로 조사되었다 (1). 일반적으로는 감기와 유사한 증상을 나타내며 대부분의 경우에 자연적으로 치

유가 되나 영유아 및 노인들의 경우 심각한 급성 하기도 감염(lower respiratory tract illness: LRTI)을 유발할 수 있으며 심한 경우 사망에 이를 수 있다. 이러한 심각성에도 불구하고 현재까지 임상적으로 사용될 수 있는 RSV 감염을 억제할 수 있는 백신이나 효과적인 치료제는 전무하다. 현재 RSV 감염 치료를 위해 승인된 유일한 치료제는 ribavirin (virazole)이지만 임상적 효능이 크지 않고 높은 독성과 투여의 불편함으로 인해 널리 사용되지 않고 있으며 일부 제한된 경우에만 사용되고 있다.

RSV는 감염 후 숙주세포에서 10개의 유전자로부터 Non-structural protein (NS)1, NS2, P, N, M, M2-1, M2-2, SH, G, F 및 L 등의 11가지 단백질을 합성한다. 이들 중 F 단백질(융합단백질), G 단백질(당단백질)과 SH 단백질이 표

Received: June 2, 2014/ Revised: June 20, 2014/ Accepted: June 24, 2014

*Corresponding author: Kyung-Soo Inn. Department of Pharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyung Hee University, 26 Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul, 130-701, Korea.

Phone: +82-2-961-0368, Fax: +82-2-966-3885, e-mail: innks@khu.ac.kr

**This work was supported by the Korea Foundation for the Advancement of Science & Creativity (KOFAC), and funded by the Korean Government (MOE).

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

면항원으로 작용한다. G 단백질은 감염될 숙주세포에 부착하는데 관여하며, F 단백질은 세포막의 융합을 통한 거대세포의 형성과 바이러스의 침투에 관여한다. 표면항원인 F 단백질 및 G 단백질은 중화항체 생성을 유도할 수 있으며 바이러스 중화능을 가지는 F 단백질에 대한 인간화 단일클론항체인 Synagis가 개발되어 고위험군의 감염을 예방하기 위한 수동면역(passive immunization) 방식으로 사용되고 있다.

RSV는 다른 파라믹소 바이러스들과 달리 두 개의 non-structural 단백질인 NS1과 NS2를 가지며 이 NS 단백질들은 RSV 단백질들 중 감염된 세포에서 가장 많이 생성되는 단백질들이다 (3). RSV의 NS1/NS2는 타 바이러스의 non-structural 단백질들과 마찬가지로 비리온에는 포함되지 않으며 감염된 세포에서만 발현되어 바이러스의 증식을 촉진하고 면역반응 등을 포함한 다양한 신호전달과정을 조절하는 역할을 수행한다 (4). 수많은 기능이 밝혀진 인플루엔자 바이러스의 NS1과는 달리 RSV의 NS1/NS2의 기능에 대한 연구는 미진하였으나 NS1/NS2 유전자의 제거 혹은 돌연변이를 유도한 바이러스가 개발되면서 이를 이용하여 최근 NS1/NS2의 다양한 기능이 밝혀지고 있다. 본 종설에서는 지금까지 밝혀진 NS1/NS2의 기능에 관한 연구결과들을 살펴보고 이를 통한 새로운 치료제 및 백신의 개발에 대한 시도 및 향후 연구방향에 관해 고찰해 보고자 한다.

1. RSV 감염의 임상적 특징 및 감염에 대한 면역반응

RSV 감염은 대부분의 영유아가 2세 이전에 경험할 정도로 소아 하기도 감염 질환의 주요 원인체로 바이러스성 하기도 감염에 의한 입원의 가장 큰 원인이다. 특히 조산아, 폐이형성증, 낭포성섬유증, 선천성 심장병을 가진 영유아 혹은 면역저하 환자가 고위험군으로 알려져 있으며, 만 1세 미만의 소아에서는 인플루엔자바이러스에 의한 사망의 약 9배에 이르는 매우 주요한 사망원인이다 (5). 2005년의 경우 세계적으로 약 66,000~199,000명의 5세 이하의 소아가 RSV에 의한 급성 하기도 감염에 의해 사망한 것으로 판단되었다 (6). 2008년 미국의 경우 1세 미만의 소아에서 약 5만에서 8만에 이르는 RSV에 의한 기관지염으로 인한 입원이 있었고, 약 2만에서 4만건의 입원은 RSV에 의한 폐렴으로 인한 것으로 추정되

었다 (7). 또한 영아기의 RSV에 의한 기관지염은 이후의 천식 발생과 밀접한 연관이 있는 것으로 보고되었다 (8). 생후 2년간 두 번 이상의 감염을 겪는 경우는 매우 흔하며 일생을 통하여 여러 번 감염이 발생하게 되어 자연적인 RSV의 감염은 지속적인 방어능을 형성하지 못하는 것으로 판단된다. 실제 인간과 유사한 증상을 나타낼 수 있는 동물모델이 없어 RSV 감염 후 나타나는 면역반응에 관해서는 현재까지 잘 알려져 있지 않다. 현재까지의 많은 연구결과들은 RSV 감염 후 이에 대한 면역반응이 RSV에 의한 질환의 병리와 관련되어 있음을 시사하고 있다 (9). RSV 감염 후 사망한 환자의 조직학적 분석결과에 의하면 소기도(small airway)가 염증성세포, 세포의 잔해, 부종 등에 의해 심한 폐쇄현상을 보임이 확인되었다 (10). 침윤된 면역세포들은 큰포식세포(macrophage), 중성구(neutrophil)와 CD4, CD8 T 세포 등으로 면역반응과 질환의 진행에 연관이 있음을 강하게 시사하였다. 또한 성인을 대상으로 한 시험에서는 감염 후 비강 흡인물 내의 염증성 사이토카인 및 케모카인의 양과 질병의 진행과 강한 상관관계가 관찰되었고 여러 연구에서 기도 내의 중성구의 양과 질병의 진행과 상관관계가 보고되어 숙주의 면역반응과 질병의 진행간에 밀접한 상관관계가 있음을 증명하였다 (11). 대부분의 RSV 감염은 감기와 유사한 증상을 보이다가 자연적으로 치유되게 되는데 이러한 방어능은 주로 중화항체에 의한 것으로 알려지고 있다. 코튼랫(cotton rat)모델 등을 사용한 초기 연구결과들은 중화항체를 전달받은 동물들이 RSV 감염으로부터 보호될 수 있음을 보여주었고 이러한 결과들은 현재 사용 중인 Synagis 항체개발의 주요한 근거가 되었다 (12~15). RSV는 다른 호흡기 바이러스와 마찬가지로 호흡기의 상피세포에 감염된 후 폐의 큰포식세포, 점막의 수지상세포 등과 접촉하게 되고 이러한 세포들에 의해 유발된 선천 면역반응, 즉 인터페론 및 염증성 사이토카인과 케모카인들이 이후의 능동면역반응을 유발하게 된다. 이러한 초기의 선천면역반응에는 Toll-like receptor (TLR)-2, 4, 6 등을 포함하는 TLR과 retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)을 포함하는 세포 내 RNA 센서, 그리고 nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) 수용체 등의 Pattern recognition receptor (PRR)들이 관여한다 (16, 17). 이러한 항바이러스성 면역반응과 바이러스간의 상호작용에 대한 이해는 바이러스에 의한 병리의 이해 및 항바이러스제와 백신의 개발에 필수적이다. 특히 RSV의 NS1과 NS2는 이

러한 면역반응의 조절에 여러 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.

2. RSV 바이러스 NS1/NS2 단백질의 개요

NS1과 NS2 유전자는 RSV 유전자의 3'의 시작부위에 존재하는 유전자로 각각 139개와 124개의 아미노산으로 구성된 단백질을 생성한다. NS1과 NS2 유전자는 파라믹소 바이러스 중 RSV만이 가지고 있으며 여러 가지 측면에서 매우 독특한 특징을 보인다. NS1과 NS2는 bovine RSV 등 인간 RSV가 아닌 RSV strain과 RSV와 아주 근접한 관계를 가지는 pneumonia virus of mice (PVM)의 유사단백질(homolog)를 제외하고는 다른 바이러스 및 포유동물의 어떠한 유전자와도 의미 있는 유사성을 나타내지 않는다 (18). NS1과 NS2간에 염기서열에는 유사성이 없으나 인터페론억제 등의 기능은 공유하고 있는 것으로 보고되었다 (18). 이 독특한 두 개의 단백질들은 homodimer 형태 및 heterodimer 형태로도 존재할 수 있는 것으로 밝혀졌고 함께 발현될 경우 상승효과를 나타내기도 하며 각 단백질들의 세포 내 위치에도 변화가 있는 것으로 확인되어 단독으로 혹은 함께 여러 다양한 기능을 수행할 것으로 예상된다 (19, 20).

3. RSV NS1/NS2에 의한 인터페론 신호전달체계의 조절

RSV는 다른 파라믹소 바이러스들에 비해 매우 효과적으로 인터페론의 작용을 억제한다. Atreya 등의 연구에 따르면 10,000 U/ml의 알파인터페론 혹은 베타인터페론은 폐 상피세포에서의 3형 파라인플루엔자 바이러스 (parainfluenza virus type 3)의 증식을 1,000에서 10,000배 정도 억제하는데 비해 RSV의 증식은 10내지 20배 정도 억제하였다 (21). 이러한 인터페론과 관련된 신호전달체계의 조절은 주로 NS1/NS2에 의해 이루어지는 것으로 알려졌다. NS1과 NS2 유전자 중 하나 혹은 모두를 제거한 재조합 바이러스(Δ NS1, Δ NS2, Δ NS1/2)의 경우 자연형 (wild-type: WT) 바이러스에 비해 증식이 크게 억제되지만 인터페론을 생성할 수 없는 Vero 세포에서는 자연형과 유사한 증식을 나타내는 것이 여러 연구를 통해 확인되면서 이들의 가장 주요한 기능이 인터페론의 생성 억제 혹은 인터페론에 의한 신호전달의 억제인 것으로 확인되었

다 (19, 22~24). 사람 비강 상피세포의 경우 RSV 감염 후 1형 인터페론(type-I interferon)인 알파인터페론과 베타인터페론의 발현은 극히 낮으나 3형 인터페론인 람다인터페론(interferon- λ ; IFN- λ)이 주로 발현되는 것으로 알려졌는데 NS1/NS2는 이러한 IFN- λ 의 발현도 효과적으로 억제하는 것으로 확인되었다 (24, 25). NS1/NS2는 RIG-I와 TLR에 의한 인터페론의 생성을 모두 억제하는 것으로 알려져 있다. NS1/NS2에 의한 인터페론 및 염증성 사이토카인과 케모카인의 발현 억제의 기전으로 처음 제시된 것은 이들의 발현에 결정적인 역할을 하는 interferon regulatory factor 3 (IRF3)와 nuclear factor kappaB (NF- κ B)의 활성화와 핵으로의 이동 억제이다. Δ NS1, Δ NS2, Δ NS1/2 바이러스를 감염시킨 결과 WT 바이러스에 비해 IRF3와 NF- κ B의 핵 내로의 이동이 현저히 증가하였다 (19). 또한 NS2는 직접적으로 RIG-I의 CARD 도메인에 결합하여 RIG-I와 미토콘드리아에 존재하는 MAVS (IPS-1)와의 결합을 억제함으로써 RIG-I에 의한 인터페론의 생성을 억제할 수 있음이 보고되었다 (26). 이후의 많은 연구들은 NS1과 NS2가 IRF3뿐만 아니라 여러 인터페론 생성 신호전달에 필수적인 단백질들을 저해함을 보여주었다(Fig. 1). NS1 혹은 NS2의 과발현은 TLR 및 RIG-I 신호전달에 필수적인 TRAF3의 단백질 생성을 억제하였고 NS1은 추가적으로 IKK ϵ 의 발현도 억제하였다 (27). NS1과 NS2는 여러 연구를 통해 인터페론 생성을 위한 신호전달뿐만 아니라 JAK-STAK 신호전달과정을 저해하여 생성된 인터페론에 의한 항바이러스 신호전달을 억제함이 여러 연구에 의해 밝혀졌다. 독립된 연구에서 NS1과 NS2는 각각 STAT2의 양을 감소시킴으로써 인터페론에 의한 신호전달을 억제할 수 있음이 확인되었다 (28, 29). NS1은 세포 내 E3-ubiquitin 중합효소인 elongin C와 culin2와 결합할 수 있었으며 이를 통해 STAT2의 유비퀴틴화(ubiquitination)를 유도하여 프로테아좀(proteasome)에 의한 단백질의 분해를 유도하는 기전을 사용한다 (30). 최근의 Goswami 등의 연구는 NS1과 NS2가 감염 후 미토콘드리아로 이동하여 300~750 kDa에 이르는 단백질 복합체의 형성을 유도하여 여러 단백질의 분해를 촉진하고 이를 통해 인터페론의 형성을 억제하며 이 과정에서 MAVS가 중요한 역할을 수행함을 보여주었다 (31).

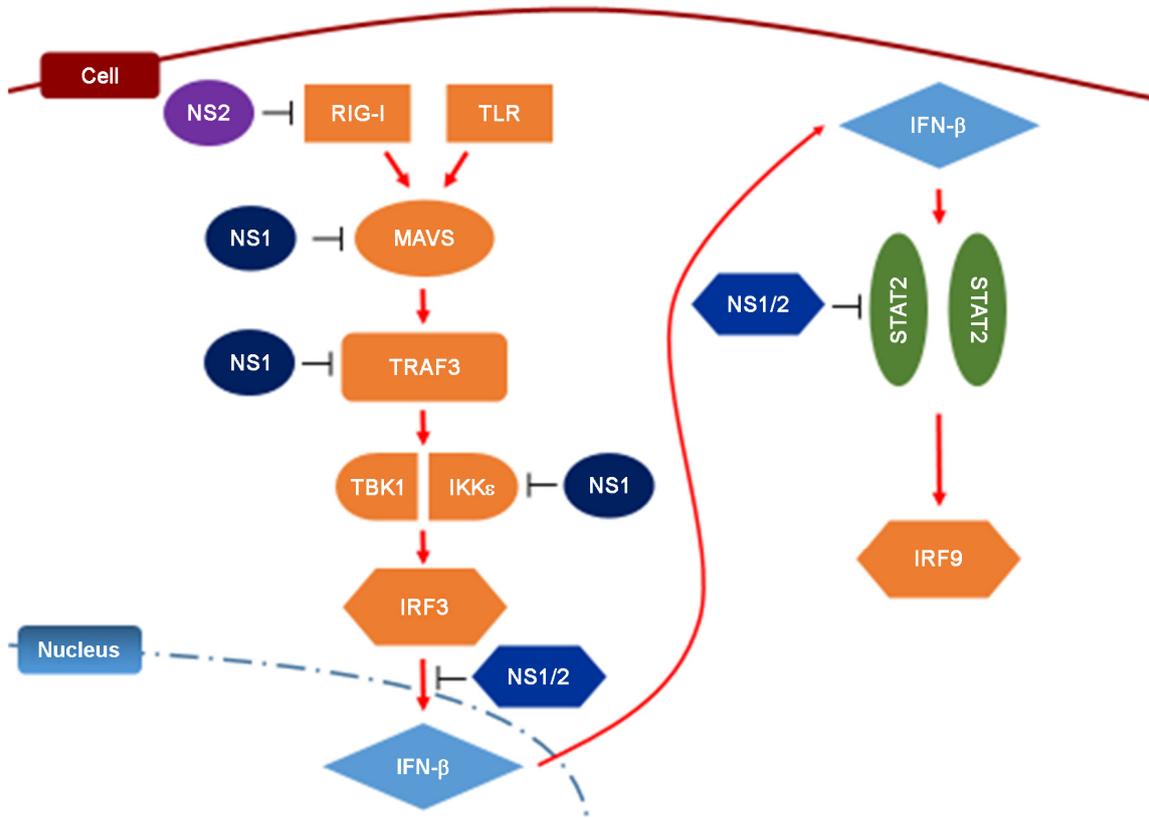


Figure 1. Inhibition of antiviral interferon signaling pathway by RSV NS1 and NS2. NS1 and NS2 suppress type-I interferon signaling by targeting various key components of RIG-I (retinoic acid-inducible gene 1) and TLR (toll-like receptor) signaling pathways such as MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein), TRAF3, IRF3 (interferon regulatory factor) and STAT2 (signal transducer and activator of transcription 2).

4. NS1/NS2에 의한 능동면역 (adaptive immunity)의 조절

NS1/NS2는 인터페론에 의한 항바이러스 작용 외에 능동면역반응을 조절하는 기능도 수행하고 있다. 특히 NS1/NS2는 면역세포들의 활성화와 분화를 조절하는 기능을 가지고 있음이 여러 연구에서 확인되었다. ΔNS1 재조합바이러스가 감염된 수지상세포는 WT 바이러스가 감염된 세포에 비해 높은 수준의 성숙(maturation) 정도를 나타냈고 사이토카인과 케모카인의 발현 역시 증가하였다. ΔNS2 바이러스는 이러한 결과를 나타내지는 않았지만 ΔNS1/2 바이러스의 경우 이러한 현상이 ΔNS1에 비해 높게 나타나 두 단백질 모두 관여함을 시사하였다. 바이러스 감염 전에 인터페론 수용체를 항체를 사용하여 억

제한 경우 이러한 현상이 완화되어 NS1/NS2 단백질의 인터페론 신호전달 억제가 이러한 세포의 분화 조절에 관여함을 보여주었다 (32). 수지상세포의 성숙을 조절하는 효과는 항원제시에 영향을 미치게 되고 T 세포의 활성화에도 영향을 미칠 수 있다. 실제 ΔNS1 RSV가 감염된 수지상세포는 WT 바이러스가 감염된 세포에 비해 높은 수준의 점막으로 이동할 수 있는 CD103+ CD8+ T 세포 활성화와 증식을 유도하였고 Th17 세포의 활성화와 증식도 높은 수준으로 유도하였다 (33). 이러한 효과는 최소 부분적으로는 인터페론 억제효능과 무관하였다. 수지상세포 뿐만 아니라 NS1을 발현하는 호흡기 상피세포 역시 T 세포의 Th1, Th2, Th17 으로의 분화를 억제함이 최근의 연구에서 밝혀졌다 (34).

5. NS1과 NS2의 면역반응 조절 이외의 기능

NS1과 NS2의 기능에 관한 초기 연구에 따르면 NS1은 minigenome의 전사와 RNA 복제의 저해역할을 수행한다 (35). 이러한 바이러스 유전자의 전사 조절은 세포 내 과도한 바이러스 RNA의 생성을 막아 이를 인지하는 선천 면역시스템의 면역반응 유도를 억제하는 효과도 있을 것으로 판단되며 RNA-dependent RNA polymerase의 작용을 적절한 수준에서 통제하는 것으로 여겨지나 이에 대한 자세한 기전과 효과에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다.

2000년에 발표된 Jin 등의 연구에 따르면 ΔNS1 RSV를 인터페론을 생산하지 못하는 Vero 세포에 감염시킨 경우 여전히 WT 바이러스에 비해 낮은 증식능을 보였다 (36). 또한 RSV의 NS1과 NS2를 PIV의 V 단백질로 대체한 재조합 바이러스의 경우 인터페론 저해능은 복구되었으나 바이러스의 증식능은 완전히 회복되지 않아 RSV의 NS1과 NS2가 인터페론의 조절 이외의 바이러스의 효율적인 증식을 위한 기능을 가지고 있음을 보여주었다 (37). 실제 NS1과 NS2는 감염된 세포의 조기 자가사멸(early apoptosis)를 억제하여 바이러스의 증식이 충분히 이루어지도록 하는 기능을 수행하는 것으로 밝혀졌다. 또한 이러한 기능은 Vero 세포에서도 작용함으로써 인터페론과는 무관한 기전을 사용함을 시사하였다 (38). 세포사멸을 억제하기 위해서 NS1/NS2는 여러 anti-apoptotic factor들을 활성화시키거나 유도하는 것으로 보고되었으나 보다 자세한 분자수준에서의 기전에 대해서는 추가적인 연구가 요구된다.

Liesman 등에 의한 최근의 연구는 NS2가 단순히 바이러스의 증식에 영향을 미치는 것이 아니라 단독으로도 RSV에 의한 병리에 직접적으로 관여함을 증명해 주었다 (39). RSV 감염에 의한 병리현상 중 하나인 기도 상피세포 섬모의 파손 및 말초기도의 폐쇄를 NS2가 직접적으로 유도할 수 있음을 NS2가 제거된 바이러스와 RSV NS2를 가지는 재조합 PIV3 바이러스를 이용하여 증명하였고 이는 NS2가 RSV에 의한 질환의 진행에 결정적인 역할을 수행함을 보여준다 (39).

CLOSING REMARK

RSV의 NS1/NS2는 염기서열뿐만 아니라 기능적으로도 다른 바이러스들의 nonstructural protein들과 확연한 차이를 보이며 인플루엔자 바이러스의 NS1과 마찬가지로 매우 다양한 역할을 수행하지만 이에 대한 연구는 매우 미진한 상황이다. 지금까지의 연구는 주로 인터페론의 신호 전달에 중점을 두고 이루어져 왔지만 최근 들어 다양한 세포 내 신호전달에 관여할 가능성이 대두되고 있다. 특히 최근의 proteomics 연구결과는 NS1의 경우 약 200여 개의 숙주 단백질과 결합할 수 있음을 보여주었고 이는 NS1이 기존에 알려진 기능 이외에도 많은 기능을 추가적으로 가지고 있음을 시사하고 있다 (40). 실제 NS1이 세포주기, DNA repair 등에 관여하는 단백질과도 결합하는 것으로 확인되어 이러한 상호작용의 의미에 대한 연구가 추가적으로 요구된다. 또한 지금까지의 많은 연구들이 NS1 단독, 혹은 NS2 단독으로 이루어져 왔으나 앞서 기술한 대로 최근 NS1과 NS2가 homodimer와 heterodimer 형태로 존재할 수 있음이 확인되어 이러한 상호작용과 기능과의 관계 역시 추가로 규명되어야 할 필요가 있다. NS1/NS2가 제거되거나 돌연변이를 유도한 재조합바이러스의 경우 병원성과 증식능이 크게 약화되어 여러 연구를 통해 백신주로 사용하기 위한 시도들이 진행되고 있다. 특히 최근 밝혀진 대로 NS2의 경우 직접적으로 병리에 영향을 미치기 때문에 이러한 백신들의 경우 보다 안전하고 효능이 높을 수 있을 것으로 기대된다. 또한 NS2의 기능을 억제할 수 있는 약물의 경우 RSV에 의한 질환의 진행을 억제할 수 있을 것으로 예상되어 새로운 약물개발의 타겟이 될 수 있을 것으로 기대된다.

REFERENCES

- 1) Hall CB1, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, *et al.* The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med* 2009;360:588-98.
- 2) Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child* 1986;140:543-6.
- 3) Pastey MK, Samal SK. Nucleotide sequence analysis of the non-structural NS1 (1C) and NS2 (1B) protein genes of bovine

- respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 1995;76:193-7.
- 4) Teng MN. The non-structural proteins of RSV: targeting interferon antagonists for vaccine development. *Infect Disord Drug Targets* 2012;12:129-37.
 - 5) Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Cox N, Anderson LJ, *et al.*, Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA* 2003; 289:179-86.
 - 6) Nair HI, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, *et al.* Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2010;375:1545-55.
 - 7) Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA* 1999;282:1440-6.
 - 8) Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1501-7.
 - 9) Varga SM, Braciale TJ. The adaptive immune response to respiratory syncytial virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013; 372:155-71.
 - 10) Johnson JE, Gonzales RA, Olson SJ, Wright PF, Graham BS. The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection. *Mod Pathol* 2007;20:108-19.
 - 11) DeVincenzo JP, Wilkinson T, Vaishnav A, Cehelsky J, Meyers R, Nochur S, *et al.* Viral load drives disease in humans experimentally infected with respiratory syncytial virus. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:1305-14.
 - 12) Hall CB, Walsh EE, Long CE, Schnabel KC. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 1991;163:693-8.
 - 13) Prince GA, Horswood RL, Camargo E, Koenig D, Chanock RM. Mechanisms of immunity to respiratory syncytial virus in cotton rats. *Infect Immun* 1983;42:81-7.
 - 14) Prince GA, Horswood RL, Chanock RM. Quantitative aspects of passive immunity to respiratory syncytial virus infection in infant cotton rats. *J Virol* 1985;55:517-20.
 - 15) Taylor G, Stott EJ, Bew M, Fernie BF, Cote PJ, Collins AP, *et al.* Monoclonal antibodies protect against respiratory syncytial virus infection in mice. *Immunology* 1984;52:137-42.
 - 16) Kim TH, Lee HK. Innate immune recognition of respiratory syncytial virus infection. *BMB Rep* 2014;47:184-91.
 - 17) Mukherjee S, Lukacs NW. Innate immune responses to respiratory syncytial virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013;372:139-54.
 - 18) Barik S. Respiratory syncytial virus mechanisms to interfere with type 1 interferons. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013; 372:173-91.
 - 19) Spann KM, Tran KC, Collins PL. Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and proinflammatory cytokines. *J Virol* 2005;79:5353-62.
 - 20) Swedan S, Andrews J, Majumdar T, Musiyenko A, Barik S. Multiple functional domains and complexes of the two non-structural proteins of human respiratory syncytial virus contribute to interferon suppression and cellular location. *J Virol* 2011;85:10090-100.
 - 21) Atreya PL, Kulkarni S. Respiratory syncytial virus strain A2 is resistant to the antiviral effects of type I interferons and human MxA. *Virology* 1999;261:227-41.
 - 22) Teng MN, Collins PL. Altered growth characteristics of recombinant respiratory syncytial viruses which do not produce NS2 protein. *J Virol* 1999;73:466-73.
 - 23) Teng MN, Whitehead SS, Bermingham A, St Claire M, Elkins WR, Murphy BR, *et al.* Recombinant respiratory syncytial virus that does not express the NS1 or M2-2 protein is highly attenuated and immunogenic in chimpanzees. *J Virol* 2000; 74:9317-21.
 - 24) 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;78:4363-9.
 - 25) Okabayashi T, Kojima T, Masaki T, Yokota S, Imaizumi T, Tsutsumi H, *et al.* Type-III interferon, not type-I, is the predominant interferon induced by respiratory viruses in nasal epithelial cells. *Virus Res* 2011;160:360-6.
 - 26) Ling ZI, Tran KC, Teng MN. Human respiratory syncytial virus nonstructural protein NS2 antagonizes the activation of beta interferon transcription by interacting with RIG-I. *J Virol* 2009;83:3734-42.
 - 27) Swedan S, Musiyenko A, Barik S. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins decrease levels of multiple members of the cellular interferon pathways. *J Virol* 2009;83:9682-93.
 - 28) Xu X, Zheng J, Zheng K, Hou Y, Zhao F, Zhao D. Respiratory syncytial virus NS1 protein degrades STAT2 by inducing

- SOCS1 expression. *Intervirology* 2014;57:65-73.
- 29) Ramaswamy M, Shi L, Varga SM, Barik S, Behlke MA, Look DC. Respiratory syncytial virus nonstructural protein 2 specifically inhibits type I interferon signal transduction. *Virology* 2006;344:328-39.
- 30) Elliott J, Lynch OT, Suessmuth Y, Qian P, Boyd CR, Burrows JF, *et al.* Respiratory syncytial virus NS1 protein degrades STAT2 by using the Elongin-Cullin E3 ligase. *J Virol* 2007;81:3428-36.
- 31) Goswami R, Majumdar T, Dhar J, Chattopadhyay S, Bandyopadhyay SK, Verbovetskaya V, *et al.* Viral degradasome hijacks mitochondria to suppress innate immunity. *Cell Res* 2013;23:1025-42.
- 32) Munir S, Le Nouen C, Luongo C, Buchholz UJ, Collins PL, Bukreyev A. Nonstructural proteins 1 and 2 of respiratory syncytial virus suppress maturation of human dendritic cells. *J Virol* 2008;82:8780-96.
- 33) Munir S, Hillyer P, Le Nouën C, Buchholz UJ, Rabin RL, Collins PL, *et al.* Respiratory syncytial virus interferon antagonist NS1 protein suppresses and skews the human T lymphocyte response. *PLoS Pathog* 2011;7:e1001336.
- 34) Qin L, Peng D, Hu C, Xiang Y, Zhou Y, Tan Y, *et al.* Differentiation of Th subsets inhibited by nonstructural proteins of respiratory syncytial virus is mediated by ubiquitination. *PLoS One* 2014;9:e101469.
- 35) Atreya PL, Peoples ME, Collins PL. The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication. *J Virol* 1998;72:1452-61.
- 36) Jin H, Zhou H, Cheng X, Tang R, Munoz M, Nguyen N. Recombinant respiratory syncytial viruses with deletions in the NS1, NS2, SH, and M2-2 genes are attenuated *in vitro* and *in vivo*. *Virology* 2000;273:210-8.
- 37) Tran KC, He B, Teng MN. Replacement of the respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 by the V protein of parainfluenza virus 5. *Virology* 2007;368:73-82.
- 38) Bitko V, Shulyayeva O, Mazumder B, Musiyenko A, Ramaswamy M, Look DC, *et al.* Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF-kappaB-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth. *J Virol* 2007;81:1786-95.
- 39) Liesman RM, Buchholz UJ, Luongo CL, Yang L, Proia AD, DeVincenzo JP, *et al.* RSV-encoded NS2 promotes epithelial cell shedding and distal airway obstruction. *J Clin Invest* 2014;124:2219-33.
- 40) Wu W, Tran KC, Teng MN, Heesom KJ, Matthews DA, Barr JN, *et al.* The interactome of the human respiratory syncytial virus NS1 protein highlights multiple effects on host cell biology. *J Virol* 2012;86:7777-89.
- 41) Thornburg NJ, Hayward SL, Crowe JE Jr. Respiratory syncytial virus regulates human microRNAs by using mechanisms involving beta interferon and NF-kappaB. *MBio* 2012;3.