

# Biologia molekularna wirusów z rodzaju *Pestivirus*

Tomasz Stadejek  
Zygmunt Pejsak  
Zakład Chorób Świń  
Instytut Weterynarii  
Puławy

**P**estiwirusy stanowią małą, ale bardzo ważną z epizootycznego i ekonomicznego punktu widzenia, grupę w skład której wchodzi wirusy: pomoru klasycznego świń (HCV), wirusowej biegunki i choroby błon śluzowych bydła (BVDV) oraz choroby granicznej owiec (BDV). Na podstawie badań strategii replikacji i organizacji genomu rodzaj *Pestivirus* przeniesiono niedawno z rodziny *Togaviridae* do rodziny *Flaviviridae* (1).

Ostatnie lata przyniosły znaczny postęp w badaniach nad wspomnianą grupą wirusów. Przełomem stało się opublikowanie kompletnych sekwencji nukleotydowych cDNA szczepów NADL (2) i Osloss (3) — BVDV oraz Alfort (4) i Brescia (5) — HCV. Wykazano (6), że materiałem genetycznym pestiwirusów jest jednoniciowy, pozytywnie spolaryzowany RNA polyA(-) o wielkości od 12,280 zasad (z) (Brescia) do 12,573 z (NADL). Inicjacja replikacji wymienionej grupy wirusów zapoczątkowana jest translacją macierzystego RNA i produkcją wirusowej polimerazy niezbędnej do transkrypcji genomowego (+)RNA i powstania nici niekodującej (-), a następnie potomnych nici kodujących (+) (7). Te ostatnie służą jako matryca do translacji w obrębie pojedynczej, dużej ramki odczytu (*open reading frame* — ORF). W przypadku HCV, podobnie jak u BVDV i BDV, nie wykryto subgenomowego RNA w zakażonych komórkach. Ramka odczytu ograniczona jest na końcu 5' regionem niekodującym o długości 360-385 nukleotydów, a na końcu 3' regionem niekodującym o długości 186-229 nukleotydów. Dane odnośnie do różnic w długości regionów niekodujących, prezentowane przez poszczególnych autorów (2, 3, 4, 5), wskazują, że prawdopodobnie nie wszystkie dostępne biblioteki cDNA zawierają precyzyjne sekwencje końców 5' i 3'. Jednoznaczne ustalenie terminalnych sekwencji genomu pestiwirusów wymagać będzie prawdopodobnie bezpośredniego sekwencjonowania wirusowego RNA. Porównanie opublikowanych sekwencji nukleotydowych wykazało 88% homologii pomiędzy szczepami HCV — Alfort i Brescia, 74% pomiędzy szczepami BVDV — NADL i Osloss, oraz 66% pomiędzy szczepami NADL i Alfort (4,8). Na poziomie aminokwasowym homologia wynosi 86% dla szczepów BVDV, 93% dla szczepów HCV, zaś między szczepami BVDV i HCV wykazano 70% homologii (4, 5, 8). ORF obejmuje obszar genomu kodujący 3898 aminokwasów u szczepów HCV i 3988 aminokwasów u szczepu NADL (4, 5, 8). Obecność poje-

dynczej ramki odczytu sugeruje, że podczas translacji powstaje jedna poliproteina spełniająca rolę prekursora wirusowych białek. Ich liczba, masa cząsteczkowa i nazewnictwo nie zostały jednoznacznie ustalone. Aktualnie przyjmuje się schemat genomu oraz regiony kodowania białek według modelu zaproponowanego przez Colleta i wsp. (8, 9, 10). Model ten, opracowany dla szczepu NADL, najprawdopodobniej można odnieść do wszystkich pestiwirusów. Wspomniani autorzy wykorzystali w swej pracy białka uzyskane na drodze ekspresji w systemie *E. coli* oraz syntetyczne peptydy reprezentujące specyficzne sekwencje ramki odczytu pestiwirusów jako immunogeny do produkcji wysoce specyficznych surowic. Były one wykorzystane w radioimmunoprecypitacji do identyfikacji białek wirusowych i lokalizacji miejsca ich kodowania w genomie (9, 10).

Białka strukturalne pestiwirusów są kodowane począwszy od 5' końca genomu. Pierwsze z nich, p20 posiada aktywność proteolityczną i masę cząsteczkową od 19 do 23 kDa, zależnie od systemu użytego do elektroforezy (11,12). Thiel i wsp. (11) przedstawili dane świadczące, że p20 nie wchodzi w skład nukleokapsydu. Dopiero następne w kolejności kodowane przez ORF białko, p14 jest składnikiem nukleokapsydu. Za białkiem p14 ORF koduje trzy glikoproteiny gp48, gp25 i gp53. Ich powstanie jest wynikiem szeregu etapów dojrzewania, w których występują przejściowe formy prekursorowe glikoprotein: gp140, obejmujące również nieglikozylowane białko p14, gp116, gp75 i główny prekursor gp62 (10). Dojrzałe glikoproteiny są stabilne i występują jako kompleks białek połączonych wiązaniami dwusiarczkowymi (11,13). Wchodzą one w skład otoczki pestiwirusów i jako takie warunkują ich tropizm komórkowy i adsorpcję na powierzchni komórki gospodarza oraz indukcję odpowiedzi immunologicznej ze strony zakażonego organizmu.

Collet i wsp. (8) oraz Wensvoort i wsp. (14) uzyskali przeciwciała monoklonalne zdolne do neutralizacji wirusów BVD i HC, wiążące się z epitopami na cząsteczce gp53. Immunizacja świń i myszy rekombinowanym wirusem krowianki z insertem regionu kodującego białka strukturalne HCV indukowała wystąpienie pełnej odporności na zakażenie kontrolne wirusem HC. Immunizacja zwierząt rekombinantem, w którym brakowało większej części genu gp55 (gp53) również doprowadziła do wystąpienia odporności, nie powstały jednak przeciwciała neutralizujące (15).

Glikoproteina gp25 prawdopodobnie jest białkiem transmembranowym stanowiącym miejsce wiązania dla gp53 (13). Rola jaką odgrywa glikoproteina gp48 pozostaje niejasna.

Fragment ORF, w kierunku 3' od regionu kodującego białka strukturalne, koduje niestrukturalne białko p125. W izolatach niecytopatycznych (ncp) BVDV, p125 jest jedynym produktem ekspresji tego regionu, podczas gdy w izolatach cytopatycznych (cp), obok tego białka, powstają dwa inne produkty: p54 i p80, obejmujące sekwencję p125. Ekspresja białka p80 uważana jest za marker cytopatycznych szczepów BVDV (16). Wykazano jednak, że superinfekcja komórek zkażonych pestiwirusami ncp, przy użyciu wirusa cp, nie daje efektu cytopatycznego, chociaż p80 jest produkowane (17). Rezultat

ten sugeruje, że p80 może być niezbędne, ale jednocześnie niewystarczające do wystąpienia efektu cytopatycznego. Badania porównawcze sekwencji nukleotydowych doprowadziły do wykrycia w regionie p125, powstałych w wyniku naturalnej rekombinacji RNA, małych insertów w genomach cytopatycznych szczepów BVDV. W genomie szczepu Osloss jest nim 288 nukleotydowy fragment kodujący element podobny do ubikwityny, zaś w genomie szczepu NADL, insertem jest fragment 270 nukleotydowy, homologiczny do komórkowego, różny od ubikwityny (18, 19). Qi i wsp. (20) przy użyciu PCR i sekwencjonowania regionu kodującego p125 stwierdzili obecność insertu genu ubikwityny i duplikacje fragmentu kodującego p80 w tym regionie u szczepu cp. Należy jednak zaznaczyć, że w jednym z badanych cp szczepów BVD nie stwierdzono ani insertów, ani duplikacji. Wskazuje to, że ich występowanie nie jest jedynym mechanizmem warunkującym cytopatogenność szczepów BVDV. Meyers i wsp. (21), analizując dwa terenowe cp szczepów BVDV, stwierdzili oprócz duplikacji p80, istnienie duplikacji p20 oraz obecność specyficznego białka p28, powstałego w wyniku fuzji p20 oraz części innego białka wirusowego p10. Białko p80 posiada motywy aminokwasowe charakterystyczne dla proteaz typu serynowego i helikaz RNA (22, 23, 24). Wiskerchen i Collet (25) wykazali eksperymentalnie, że p80 jest serynową proteazą, której aktywność jest niezbędna w dojrzewaniu poliproteiny. P80 jest też najbardziej konserwatywnym białkiem pestiwirusów dominującym w reakcjach immunologicznych. Wszystkie zwierzęta zakażone tymi wirusami posiadają przeciwciała anty p80. Nie ma jednak żadnych danych wykazujących, że przeciwciała te są zdolne do neutralizacji wirusa.

Tak jak wspomniano drugim produktem pochodzącym z regionu p125 jest białko p54. Jest ono jednym z najmniej konserwatywnych białek pestiwirusów (26). Posiada silnie hydrofobowy koniec aminowy i zawiera konserwatywny motyw receptora *zinc-finger* (27). Wysuwa się hipotezę, że p54 służy jako białko wiążące kompleksy replikacyjne wirusa z błonami komórkowymi (26).

W komórkach zakażonych ncp szczepami BVDV, białko p125 spełnia rolę podobną jak białka p54 i p80 w komórkach zakażonych szczepami cp.

Za regionem kodującym p125 jest zlokalizowany region kodujący nietrwałe białko p42, które rozpada się na stabilny peptyd p10 i na nie zidentyfikowany dotychczas produkt białkowy o masie 32 kD (10). Funkcjonalna rola p10 nie jest jasna, natomiast białko 32 kD może być kofaktorem białka p80 (25).

3'-końcowy region ORF koduje kolejne niestrukturalne białko p133, które dojrzewając rozpada się na stabilne białko p58 i nietrwałe p75 (10). Obecność pewnych charakterystycznych motywów sekwencyjnych może wskazywać, że białko p75 jest RNA-zależną RNA polimerazą (9). Przypuszcza się, że p58 również odgrywa rolę w replikacji RNA pestiwirusów. Być może prekursor p133, z jego składową p58, reprezentuje alternatywną formę wirusowej replikazy. Dwie różne replikazy mogą być wymagane do syntezy kodującej i nie kodującej nici pestiwirusowego RNA (26). Tak jak już wspomniano genom pestiwirusów posiada pojedynczą, dużą ramkę odczytu. Sugeruje to, że ekspresja jego genów polega na syntezie białka prekursorowego oraz jego proteoli-

tycznych przekształceniach podczas translacji i po jej zakończeniu. Pogląd ten został potwierdzony przez eksperymenty typu *pulse chase* (10, 28). Badania Colleta i wsp. (10) wykazały istnienie na poliproteinie minimum 10 miejsc, których trawienie jest wymagane do powstania dojrzałych białek wirusa; dokładne aminokwasowe pozycje miejsc trawienia nie zostały dotychczas precyzyjnie ustalone.

Pestiwirusy zaliczono do rodziny *Flaviviridae* na podstawie molekularnych cech kwasu nukleinowego oraz organizacji i charakteru kodowanego białka. Ostatnio na tej samej podstawie stwierdzono podobieństwo wirusa zapalenia wątroby C (*Human Hepatitis C Virus* — HuHCV) do wirusów wchodzących w skład wspomnianej rodziny (26, 27, 28, 29). Uzasadnia to celowość porównania wybranych danych na temat organizacji białek pestiwirusów, flawiwirusów oraz HuHCV.

Wszystkie wspomniane drobnoustroje (pestiwirusy, flawiwirusy, HuHCV) posiadają białka strukturalne kodowane na końcu 5' ich ORF. W skład protein strukturalnych flawiwirusów wchodzi: białko C nukleokapsydu, prekursorowe i dojrzałe białka błony wirionu prM i M oraz białko E otoczki (32). U pestiwirusów nie znaleziono białka, które odpowiadałoby białku prM flawiwirusów. Ramka odczytu HuHCV rozpoczyna się regionem kodowania białka nukleokapsydu C/p22. Podobnie jak u pestiwirusów nie znaleziono u HuHCV regionu kodowania białka odpowiadającego prM flawiwirusów. Bezpośrednio za białkiem C/p22 zlokalizowane są regiony kodowania glikoprotein wchodzących w skład otoczki wirionu (gp33/E1 i gp70/E2).

U wszystkich omawianych grup wirusów bezpośrednio za regionem kodującym białka strukturalne występuje region kodujący białka niestrukturalne. Niestrukturalne białko NS1 flawiwirusów odpowiada glikoproteinie otoczki pestiwirusów gp53 i glikoproteinie E2 HuHCV. Białka NS2A i 2B flawiwirusów odpowiadają białkom p54 pestiwirusów i NS2 HuHCV. Białka NS3 flawiwirusów, p80 pestiwirusów i NS3 HuHCV są polipeptydami podobnymi; wszystkie one posiadają motywy sekwencyjne charakterystyczne dla proteinaz typu serynowego i helikaz RNA. Białka NS4A i 4B flawiwirusów odpowiadają p10 i nieznanemu polipeptydowi 32kD pestiwirusów oraz NS4 HuHCV. Ostatnim białkiem niestrukturalnym kodowanym przez ORF flawiwirusów jest NS5. Podobnie jak p133 (p58 i p75) pestiwirusów oraz NS5 HuHCV na podstawie posiadania charakterystycznych motywów sekwencyjnych białko to jest uważane za RNA-zależną RNA polimerazę. Nie zdołano jednak wykazać jej aktywności *in vitro* (26).

Tak jak wskazuje przedstawiony aktualny stan wiedzy z zakresu biologii molekularnej pestiwirusów, mimo intensywnych badań nadal brakuje szeregu danych pozwalających na pełne zrozumienie zjawisk zachodzących w procesie infekcji tymi drobnoustrojami. Można sądzić, że prowadzone w wielu znanych ośrodkach naukowych badania nad strukturą, replikacją i ekspresją genów poszczególnych białek pestiwirusowych pozwolą w niedalekiej przyszłości na poszerzenie wiedzy, a tym samym na opracowanie doskonalszych metod diagnostyki i profilaktyki zakażeń pestiwirusami.

## Literatura

1. Wengler G., (1991), Classification and Nomenclature of Viruses: Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, ed. R. I. B. Francki., C. M. Fauquet., D. L. Knudson, F. Brown, Springer Verlag, Berlin.
2. Renard A., Dino D., Martial J., (1987), Vaccines and diagnostics derived from bovine diarrhoea virus. European Patent Application No. 86870095.6. Publication No. 0208672.
3. Collet M. S., Larson R., Gold C., Strinck D., Anderson D. K., Purchio A. F., (1988), *Virology*, 165, 191 - 199.
4. Meyers G., Rümenapf T., Thiel H.-J., (1989), *Virology*, 171, 555 - 567.
5. Moorman R. M. J., Warmerdam P. A. M., Van der Meer B., Schaper W. W. M., Wensvoort G., Hulst M. M., (1990), *Virology*, 171, 184 - 198.
6. Enzman P.-J., (1988), *Molecular Biology of the Virus*, in: Classical Swine Fever and Related Viral Infections, ed. B. Liess, Martinus Nijhoff Publishing, Boston.
7. Strauss E. G., Strauss J. H., (1983), *Curr. Topics Microbiol. Immun.*, 105, 1 - 98.
8. Collet M., Moening V., Horzinek M. C., (1989), *J. Gen. Virol.*, 79, 253 - 266.
9. Collet M. S., Larson R., Belzer S. K., Ratzel E., (1988), *Virology*, 165, 200 - 208.
10. Collet M. S., Wiskerchen M. A., Welniak E., Belzer S. K., (1991), *Arch. Virol. (Suppl.)*, 3, 19 - 27.
11. Thiel S. M., Stark R., Weiland E., Rümenapf T., Meyers G., (1991), *J. Virol.*, 65, 4705 - 4712.
12. Wiskerchen M., Belzer S. K., Collet M. S., (1991), *J. Virol.*, 65, 4508 - 4515.
13. Weiland E., Stark R., Haas B., Rümenapf T., Meyers G., Thiel H.-J., (1990), *J. Virol.*, 64, 3563 - 3569.
14. Wensvoort G., Boonstra J., Bonziga B. G., (1990), *J. Gen. Virol.*, 71, 531 - 540.
15. Rümenapf T., Stark R., Meyers G., Thiel H.-J., (1991), *J. Virol.*, 65, 586 - 597.
16. Meyers G., Tautz N., Dubovi E. J., Thiel H.-J., (1991), *Virology*, 180, 602 - 616.
17. Ridpath J. F., Blolin S. R., (1990), *Arch. Virol.*, 111, 247 - 256.
18. Meyers G., Rümenapf T., Thiel H.-J., (1989), *Nature*, 341, 491.
19. Meyers G., Rümenapf T., Thiel H.-J., (1990), Insertion of ubiquitin-coding sequence in the RNA genome of togavirus, in: *New Aspects of Positive Strand RNA Viruses*, ed. Brinton M. A., Heinz F. X., American Society for Microbiology, Washington D. C., 25 - 29.
20. Qi F., Rindpath J. F., Lewis T., Bolin S. R., Berry E. S., (1992), *Virology*, 189, 285 - 292.
21. Meyers M. C., Thiel H.-J., (1992), *Virology*, 191, 368 - 386.
22. Bazan J. F., Fletteric R. J., (1989), *Virology*, 171, 637 - 639.
23. Gorbalenya A. E., Donchenko A. P., Koonin V., Blinov V. M., (1989), *Nucl. Acids Res.*, 17, 3887 - 3889.
24. Gorbalenya A. E., Donchenko A. P., Koonin V., Blinov V. M., (1989), *Nucl. Acids Res.*, 17, 4713 - 4729.
25. Wiskerchen M., Collet M. S., (1991), *Virology*, 184, 341 - 350.
26. Collet M. S., (1992), *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 3, 145 - 154.
27. Moerloose de, L., Desport M., Renard A., Lecomte C., Brownlie J., Martial J. A., (1990), *Virology*, 177, 812 - 815.
28. Akkina R. K., (1991), *Virus Res.*, 19, 67 - 82.
29. Kato N., Higikata M., Ootsujama Y., Nakagawa M., Ohkoshi S., Sugimura T., Shimotohno K., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 9524 - 9528.
30. Miller R. H., Purcell R. M., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 2057 - 2061.
31. Choo Q.-L., Richman K. H., Han J. H., Berger K., Lee C., Dong C., Gallegos C., Coit D., Medina-Selby A., Barr P. J., Weiner A. J., Bradley D., Kuo G., Houghton M., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2451 - 2455.
32. Han J. H., Shyamala V., Richman K. U., Brauer M. J., Irvine B., Urdea M. S., Tekamp-Olson P., Kuo G., Choo Q.-L., Houghton M., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1711 - 1715.
33. Chambers T. J., Hahn C. S., Gallzer R., Rice C. M., (1989), *Ann. Rev. Microbiol.*, 44, 648 - 649.

## Molecular biology of the genus *Pestivirus*

### Summary

Molecular characteristics of the genome of the genus *Pestivirus* are presented. Differences in the genome organization between various viruses are described. The mechanism of the regulation of the RNA transcription and the translation processes are shown. The function of the structural and unstructural proteins produced by the viruses are also discussed in this review.

### key words:

genome organization, Pestivirus, transcription, translation.

### *Adres dla korespondencji:*

Zygmunt Pejsak, Zakład Chorób Świń, Instytut Weterynarii, al. Partyzantów, 24 - 100 Puławy.