

Wirus choroby niebieskiego języka – budowa i replikacja

WIESŁAW NIEDBALSKI, ANDRZEJ KĘSY

Zakład Pryszczycy Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola

Niedbalski W., Kęsy A.

Bluetongue virus (BTV): structure and replication

Summary

The article reviews the structure of BTV and the role of capsid proteins in the replication process. The BTV is an icosahedral virus with a genome of approximately 19 200 base pairs and composed of ten linear segments of double-stranded RNA (dsRNA). These RNA segments are packaged in a triple layered protein capsid (88 nm in diameter). The outer shell of capsid is composed of two structural proteins: 60 trimers of VP2, which acting as a hemagglutinin (HA) is responsible for glycoprotein receptor binding, and 120 trimers of VP5 that mediate the release of viral particles from endosomal compartments into cytoplasm and undergo pH dependent conformational changes that allow membrane fusion and syncytium formation. The intermediate layer consists of VP7 protein – the major immunodominant of BTV. This layer surrounds the subcore (54 nm) which consist of 12 decamers of the VP3 protein (role in the structural integrity of the virus core) and three minor structural proteins: VP1 (replicase), VP4 (mRNA capping enzyme) and VP6 (RNA-dependent ATPase and helicase). Moreover, the viral subcore consists of nonstructural proteins: NS1, NS2, NS3 and NS3A, which participate in the control of BTV replication, maturation and export from infected cell.

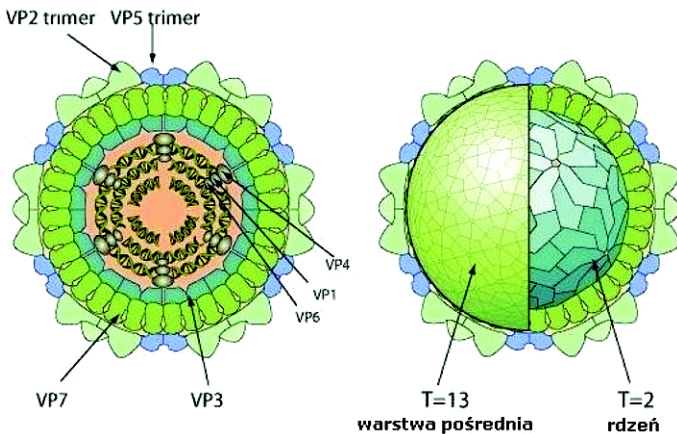
Keywords: bluetongue virus (BTV), structure, function of proteins, replication

Wirus choroby niebieskiego języka (BTV), z rodzaju *Orbivirus*, rodziny *Reoviridae*, jest czynnikiem etiologicznym choroby niebieskiego języka (BT). Chorobę charakteryzują zmiany krwotoczne, powstałe w wyniku uszkodzenia naczyń krwionośnych. Na zakażenie wirusem podatne są owce, w mniejszym stopniu bydło, kozy oraz niektóre dzikie przeżuwacze. Straty ekonomiczne, które powstają w wyniku zakażenia BTV, są bezpośrednio związane ze zmniejszeniem efektywności hodowli i śmiertelnością zwierząt oraz pośrednio z utratą rynków zbytu z powodu ograniczenia handlu zwierzętami i produktami zwierzęcego pochodzenia (nasienie i embriony). Wystąpienie BT wymaga również zastosowania określonych środków kontroli choroby, między innymi precyzyjnej diagnostyki laboratoryjnej.

Do 1998 r. chorobę niebieskiego języka stwierdzano w Europie sporadycznie i zazwyczaj wywoływana była ona przez pojedyncze serotypy BTV. Jednakże, począwszy od tego roku, choroba spowodowana przez serotypy 1, 2, 4, 8, 9 i 16 występowała w wielu europejskich krajach basenu Morza Śródziemnego (15). W sierpniu 2006 r. po raz pierwszy w historii zasięg występowania BT przekroczył 50° szerokości północnej i chorobę wywołaną przez BTV serotyp 8 stwierdzono w niektórych krajach Europy północno-zachod-

niej: Holandii, Belgii, Niemczech, Francji i Luksemburgu (27). W ostatnich kilku latach sytuacja epizootyczna w zakresie BT w Europie zmieniła się na niekorzyść i staje się coraz bardziej złożona. Przyczyną niekorzystnych zmian jest nie tylko pojawienie się nowych serotypów BTV na obszarach, na których choroba występowała endemicznie, lecz przede wszystkim jego przeniesienie na tereny dotychczas wolne od choroby (27). Występowanie BT na nowych obszarach geograficznych w Europie stwarza szczególne zagrożenie z powodu wysokiego tempa i stopnia rozprzestrzeniania się niektórych serotypów BTV oraz możliwości pojawiania się nowych wariantów (22).

Ze względu na problemy gospodarcze i epizootyczne BTV był w ostatnich latach obiektem intensywnych badań w zakresie budowy oraz funkcji struktur białkowych i genetycznych, dlatego obecnie jest najlepiej poznanym orbivirusem (21). Cząsteczka BTV (gęstość 1,337 g/cm³), o kształcie dwudziestościanu, posiada genom o wielkości około 19 200 par zasad, zbudowany z 10 liniowych segmentów podwójnie niciowego RNA (dsRNA), zawierających 57% nukleotydów AU i 43% GC oraz konserwatywne sekwencje na końcu 3' i 5' łańcucha RNA (17). Segmenty 10dsRNA upakowane są w trójwarstwowym kapsydie o średnicy około 88 nm (18). Warstwa zewnętrzna kapsydu zbu-



Ryc. 1. Schemat budowy BTV (według www.expasy.ch)

dowana jest z dwóch białek strukturalnych – 180 cząsteczek (60 trimerów) białka VP2 (111 kDa) oraz 360 cząsteczek (120 trimerów) białka VP5 (59 kDa) (ryc. 1). Warstwę pośrednią tworzy białko strukturalne VP7 (38 kDa) – główna determinanta określająca przynależność do określonej grupy serologicznej – zorganizowane w 260 trimerów formujących dwudziestocienną warstwę o symetrii $T = 13$ (20) (ryc. 1). Warstwa ta otacza rdzeń wirusa (54 nm) utworzony z 12 dekamerów białka wysokocząsteczkowego – VP3 (100 kDa) o symetrii $T = 2$ oraz trzech mniejszych białek – VP1 (149 kDa), VP4 (76 kDa) i VP6 (36 kD) (7, 18). Ponadto rdzeń wirusa tworzą białka niestrukturalne – NS1, NS2, NS3 i NS3A, które prawdopodobnie uczestniczą w kontroli replikacji wirusa, jego dojrzewaniu i uwalnianiu z zakażonej komórki. Orbiwirusy, w odróżnieniu od wirusów zawierających jednocienną RNA (ssRNA), charakteryzuje w procesie replikacji stabilność genetyczna i antygenowa, a mutacje materiału genetycznego są sporadyczne (14).

Białka strukturalne

Białko VP2. Trimery białka VP2 tworzą trój-szkieletową strukturę zewnętrzną warstwy kapsydu (7) (ryc. 1). Podczas replikacji wirusa VP2 działa jako hemaglutynina i odpowiada za wiązanie do receptora glikoproteinowego, a także indukuje wytwarzanie swoistych przeciwciał neutralizujących dla określonego serotypu BTV (9) (tab. 1). Wewnątrz komórki VP2 wiąże się z wimentyną, białkiem występującym w filamentach pośrednich szkieletu komórki, co umożliwia odpowiednią wewnątrzkomórkową lokalizację białka oraz wzajemne oddziaływanie dojrzałych cząstek wirusa i filamentów pośrednich (3). Białko VP2 jest główną determinantą serotypową BTV, co jest szczególnie istotne ze względów diagnostycznych. Filogenetyczna analiza porównawcza białka VP2 szczepów referencyjnych BTV wykazała pełną korelację pomiędzy zmiennością sekwencji w genie 2 (kodującym VP2) i przynależnością do określonego

serotypu (13). Różnice w sekwencji nukleotydów fragmentu Seg-2 kodującego białko VP2 wynoszą od 29% (BTV-8 i BTV-18) do 59% (BTV-16 i BTV-22). Sekwencjonowanie i analiza porównawcza fragmentu Seg-2 ujawnia również znaczne różnice pomiędzy szczepami tego samego serotypu, wyizolowanymi z różnych regionów geograficznych, maksymalnie dochodzące do 30% w obrębie tego samego serotypu (13). W zależności od regionu geograficznego izolacji wirusa wyodrębniono wschodnie i zachodnie topotypy VP2. Z tego powodu do typowania szczepów wirusowych i szczepionkowych BTV w reakcji RT-PCR wykorzystuje się startery oligonukleotydowe flankujące wybrane sekwencje Seg-2 (16).

Białko VP5. W odróżnieniu od VP2, białko VP5 jest bardziej konserwatywne, choć obserwuje się także niewielkie różnice w sekwencji odzwierciedlające geograficzne pochodzenie wirusa (23). Trimery białka VP5 tworzą globularne struktury zewnętrznej warstwy kapsydu BTV usytuowane pod warstwą białka VP2 (18) (ryc. 1). VP5 przenika przez błonę komórkową i uczestniczy w uwalnianiu cząstek wirusa z kompartmentów endosomalnych w cytoplazmie (10) (tab. 1). Ponadto podlega zależnym od pH zmianom strukturalnym umożliwiającym połączenie z błoną komórkową i tworzenie syncytiów (6).

Białka VP3 i VP7. Wysokocząsteczkowe białka rdzenia posiadają właściwości hydrofobowe i charakteryzują się znaczną konserwatywnością. Odgrywają ważną rolę w integralności rdzenia wirusa oraz uczestniczą w ekspresji specyficznych determinantów anty-

Tab. 1. Funkcja białek BTV w procesie replikacji

Białko	Funkcja
VP2	Hemaglutynina – odpowiada za wiązanie do receptora komórki. Indukcja wytwarzania przeciwciał neutralizujących swoistych dla serotypu BTV.
VP5	Przenika przez błonę komórkową i uczestniczy w uwalnianiu cząstek wirusa z kompartmentów endosomalnych w cytoplazmie. Umożliwia tworzenie syncytiów.
VP3/VP7	Uczestniczą w integralności rdzenia wirusa. Udział w ekspresji specyficznych grupowo determinantów antygenowych. Kompleks VP3/VP7 chroni wirusowe dsRNA przed niekorzystnym wpływem środowiska panującego wewnątrz komórki, zapobiegając aktywacji interferonu (INF) typu I przez czynniki cytoplazmatyczne. VP7 może pośredniczyć w łączeniu się wirusa do komórek owadzi oraz przenikaniu do ich wnętrza.
VP1	Replikaza (RNA polimeraza – zależna od RNA) katalizuje syntezę dsRNA na matrycy dodatniego łańcucha RNA.
VP4	Katalizator syntezy czapeczki na końcu 5' mRNA.
VP6	ATPaza zależna od RNA. Helikaza.
NS1	Udział w cytopatogenezie i uwolnieniu wirusa z komórki.
NS2	Uczestniczy w selekcji i zagęszczaniu segmentów wirusowego ssRNA przed upakowaniem genomu do kapsydu. Udział w replikacji wirusa i formowaniu jego rdzenia.
NS3/NS3A	Uczestniczy w dojrzewaniu wiriona i stymuluje proces uwalniania wirusa z komórki gospodarza.

genowych określających kilka odrębnych grup filogenetycznych (1) (tab. 1). Ponadto, w przypadku nieobecności białek VP2 i VP5, białko VP7 może pośredniczyć w łączeniu się wirusa do komórek owadzi oraz przenikaniu do ich wnętrza. W procesie tym istotną rolę odgrywa sekwencja trójpeptydowa RDG (Arg-Gly-Asp) stanowiąca fragment 168-170 łańcucha aminokwasowego VP7 (26). VP7 może wiązać się z receptorami glikoproteinowymi (glikozaminoglikany), choć jest bardzo prawdopodobne, że także inne receptory są zaangażowane w proces łączenia się wirusa z błoną komórkową i przenikaniem do jej wnętrza. Dodatkowo, kompleks VP3/VP7 chroni wirusowe dsRNA przed niekorzystnym wpływem środowiska panującego wewnątrz komórki, zapobiegając aktywacji interferonu (INF) typu I przez czynniki cytoplazmatyczne (tab. 1).

Białka VP1, VP4 i VP6. Te mniejsze białka rdzenia tworzą kompleks transkrypcyjny. Białko VP1 występujące w wirionie w niewielkiej ilości (około 12 kopii na cząsteczkę) może uczestniczyć w syntezie RNA, wydłużając startery oligo (A), funkcjonując jako replikaza syntetyzująca dsRNA na matrycy dodatniego łańcucha RNA (4) (tab. 1). VP1 posiada optymalną aktywność w zakresie 27-37°C, co zapewnia efektywną replikację zarówno w komórkach ssaków, jak i owadzi. Wczesne mRNA posiada na końcu 5' czapkę (cap), czyli 7-metyloguanozynę, która stabilizuje mRNA i ułatwia skuteczną translację. W komórkach organizmów wyższych synteza czapki wymaga udziału czterech różnych enzymów. W przypadku BTV wszystkie cztery reakcje są katalizowane przez pojedyncze białko VP4 (25). Z kolei białko VP6 posiada aktywność ATPazy zależnej od RNA oraz helikazy. Uczestniczy w rozwijaniu dupleksów dsRNA i może współuczestniczyć w syntezie mRNA na matrycy dsRNA (24) (tab. 1).

Białka niestrukturalne

W zakażonych komórkach przeżuwaczy białka NS1 i NS2 są syntetyzowane w znacznie większej liczbie kopii niż białka NS3 i NS3A. Jednakże w zakażonych komórkach owadzi również białka NS3 i NS3A syntetyzowane są w większej ilości, co może wskazywać na szczególną ich rolę w procesie replikacji i namnażania się w komórkach wektora.

Białko NS1. Obraz mikroskopowy komórek zakażonych wirusem BT ujawnia dużą liczbę kanalików (średnica 52,3 nm, długość 1000 nm) zbudowanych z białka NS1, co stanowi wewnątrzkomórkową, morfologiczną cechę zakażenia BTV. Badania Owensa i wsp. (19) wskazują na rolę NS1 w cytopatogenezie i uwolnieniu wirusa z komórki.

Białko NS2. Główny składnik wirusowych ciałek wtępowych obecnych w zakażonych komórkach. NS2 wiąże się do wirusowego ssRNA i uczestniczy w hydrolizie trójfosforanów do monofosforanów (11). Na tej podstawie można wnioskować, że białko NP2 może

być zaangażowane w selekcję i zagęszczanie segmentów wirusowego ssRNA przed upakowaniem genomu do kapsydu (tab. 1). Ekspresja NS2 w zakażonych komórkach jest wystarczająca do utworzenia ciałek wtępowych i prawdopodobnie białko to odgrywa znaczącą rolę w replikacji wirusa i formowaniu rdzenia (12).

Białko NS3 i jego skrócona forma – NS3A. Związane są z gładkimi błonami wewnątrzkomórkowymi, ale występują także na błonie plazmatycznej. Białko to, kodowane przez najmniejszy segment RNA (S10), jest jedynym białkiem glikozylowanym kodowanym przez wirus (2). NS3 funkcjonuje jako wiroporyna, która pobudza błonę komórkową, zwiększając jej przepuszczalność, dzięki temu umożliwia uwalnianie wirusa z komórki (8). Ponadto NS3, wiążąc się z białkiem komórkowym Tsg101, pozwala cząsteczkom wirusa opuścić komórki gospodarza przez pączkowanie, podobnie jak to ma miejsce w przypadku retrowirusów. Mechanizm ten może być wykorzystywany do uwalniania BTV z komórek owadzi, w których nie występuje wyraźny efekt cytopatyczny.

Replikacja BTV

Replikacja wirusa odbywa się w fagocytach mononuklearnych i komórkach endotelialnych. W wyniku ich zakażenia uwalniane są cytokiny zapalne oraz zachodzi proces apoptozy. Wirus wnika do komórki ssaków za pośrednictwem białka VP2 (hemaglutynina). Proces wnikania wirusa do komórki gospodarza zapoczątkowuje połączenie się BTV do receptorów glikoproteinowych błony komórkowej za pośrednictwem trimerów białka VP2. Cząsteczki rdzenia mogą również wiązać się z komórką (głównie owadzią) za pośrednictwem trimerów VP7. Wyniki ostatnich badań biochemicznych i mikroskopowych wykazały, że mechanizm wnikania wirusa do komórki zachodzi na drodze endocytozy receptorowej, w której pośredniczą białka z grupy klatryn (5). VP2 uwalnia się z endosomów powstających w procesie endocytozy. Obniżenie pH środowiska powoduje fuzję białka VP5 z błoną endosomalną (6) i transport transkrypcyjnie aktywnego rdzenia do cytoplazmy zakażonej komórki. Podobnie jak w przypadku innych wirusów z rodziny *Reoviridae*, replikacja BTV ma miejsce w cytoplazmie zakażonej komórki. Białko VP1 katalizuje proces transkrypcji ssRNA każdego z dziesięciu segmentów genomu BTV (4). W proces transkrypcji zaangażowane jest białko VP6, działające jako helikaza umożliwiająca rozwinięcie dsRNA, w celu przyłączenia replikazy oraz oddzielenia macierzystej i nowo zsyntetyzowanej nici RNA po zakończeniu transkrypcji. Ponadto ATPazowa aktywność tego białka wykorzystywana jest do dostarczenia energii do tego procesu (24). Do końca 5' nowo syntetyzowanego mRNA dołączana jest czapka, która powstaje dzięki guanylyl-transferazowej i transmetylazowej aktywności białka VP4 (25). Po przyłączeniu czapki mRNA transportowany jest do cytoplazmy, gdzie zachodzi proces trans-

lacji. Na matrycy mRNA syntetyzowane są białka wirusowe, a proces translacji rozpoczyna się po około 2 godzinach od zakażenia komórki. W procesie upakowania genomu do kapsydu współuczestniczą: helikaza VP6, białko NS2, a także białka VP1 i VP4 (12, 24). Jednocześnie na matrycy dodatkiego łańcucha RNA (mRNA), RNA polimeraza – zależna od RNA (replikaza) syntetyzuje nowy, jednoniciowy RNA o ujemnej polarności, który na etapie składania nowych cząstek rdzenia BTW służy jako matryca do produkcji dsRNA (4). Na podstawie badań mikroskopowych wykazano, że każdy segment dsRNA wiąże się niezależnie z kompleksem transkrypcyjnym (VP1, VP4 i VP6) usytuowanym na wewnętrznej stronie warstwy VP3 i kompleks ten przybiera kształt kwiatu (18). Warstwa rdzenia VP3 stanowi stosunkowo delikatną, niestabilną strukturę, która służy jako rusztowanie dla trimerów VP7 i po ich związaniu daje sztywniejszy, stabilniejszy rdzeń wirusa. Białka zewnętrznej warstwy kapsydu VP2 i VP5 łączą się z nowo powstałym rdzeniem i dojrzałe cząstki wirusa są transportowane w cytoplazmie przy udziale kompleksu VP2/wimentyna na mikrotubule (3). Dojrzewanie i uwolnienie wirionów z zakażonych komórek odbywa się przez błonę komórkową przez pączkowanie lub w wyniku lizy komórki, po jej destabilizacji, w której pośredniczy białko NS3 (wiroporyna) (8). Powielanie dojrzałych cząstek BTW zachodzi w czasie 8-24 godzin po zakażeniu.

Piśmiennictwo

1. Anthony S., Jonem H., Darpel K. E., Elliott H., Maan S., Samuel A., Mellor P. S., Mertens P. P.: A duplex RT-PCR assay for detection of genome segment 7 (VP7 gene) from 24 BTW serotypes. *J. Virol. Methods* 2007, 141, 188-197.
2. Beaton A., Rodriguez J., Redy Y. K., Roy P.: The membrane trafficking protein calpactin forms a complex with bluetongue virus protein NS3 and mediates virus release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002, 99, 13154-13159.
3. Bhattacharaya B., Noad R. J., Roy P.: Interaction between bluetongue virus outer capsid protein VP2 and vimentin is necessary for virus egress. *Virol. J.* 2007, 4, 7.
4. Boyce M., Wehrfritz J., Noad R., Roy P.: Purified recombinant bluetongue virus VP1 exhibits RNA replicase activity. *J. Virol.* 2004, 78, 3994-4002.
5. Forzan M., Marsh M., Roy P.: Bluetongue virus entry into the cells. *J. Virol.* 2007, 81, 4819-4827.
6. Forzan M., Wirblich C., Roy P.: A capsid protein of nonenveloped bluetongue virus exhibits membrane fusion activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 2100-2105.
7. Grimes J. M., Burroughs J. N., Gouet P., Diprose J. M., Malby R., Zientara S.: The atomic structure of the bluetongue virus core. *Nature* 1998, 395, 470-478.
8. Han Z., Harty R. N.: The NS3 protein of bluetongue virus exhibits viroporin-like properties. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 43092-43097.
9. Hassan S. S., Roy P.: Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein: role in cell entry. *J. Virol.* 1999, 73, 9832-9842.
10. Hassan S. H., Wirblich C., Forzan M., Roy P.: Expression and functional characterization of bluetongue virus VP5 protein: role in cellular permeabilization. *J. Virol.* 2001, 75, 8356-8367.
11. Horscroft N. J., Roy P.: NTP binding and phosphohydrolase activity associated with purified bluetongue virus non-structural protein NS2. *J. Gen. Virol.* 2000, 81, 1961-1965.
12. Kar A. K., Bhattacharaya B., Roy P.: Bluetongue virus RNA binding protein NS2 is a modulator of viral replication and assembly. *BMC Mol. Biol.* 2007, 8, 4.
13. Maan S., Maan N. S., Samuel A. R., Rao S., Attoui H., Mertens P. P.: Analysis and phylogenetic comparison of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes. *J. Gen. Virol.* 2007, 88, 621-630.
14. Mattos C. C. de, Mattos C. A. de, Osburn B. I., MacLachlan N. J.: Evolution of the L2 gene of strains of bluetongue virus serotype 10 isolated in California. *Virology* 1994, 201, 173-177.
15. Mellor P. S., Wittmann E. J.: Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998-2001. *Vet. J.* 2002, 164, 20-37.
16. Mertens P. P., Maan N. S., Prasad G., Samuel A. R., Shaw A. E., Portgier A. C., Anthony S. J., Maan S.: Design of primers and use of RT-PCR assays for typing European bluetongue virus isolates: differentiation of field and vaccine strains. *J. Gen. Virol.* 2007, 88, 2811-2823.
17. Mertens P. P., Sangar D. V.: Analysis of the terminal sequences of the genome segments of four orbiviruses. *Virology* 1985, 140, 55-67.
18. Nason E. L., Rothagel R., Mukherjee S. K., Kar A. K., Forzan M., Prasad D. V., Roy P.: Interactions between the inner and outer capsids of bluetongue virus. *J. Virol.* 2004, 78, 8059-8067.
19. Owens R. J., Limn C., Roy P.: Role of an arbovirus nonstructural protein in cellular pathogenesis and virus release. *J. Virol.* 2004, 78, 6649-6656.
20. Roy P.: Bluetongue virus proteins. *J. Gen. Virol.* 1992, 73, 3051-3064.
21. Roy P.: Orbiviruses, [w:] Knipe D. M., Howley P. M., Griffin D. E., Lamb R. A., Martin M. A., Roizman B., Straus S. E. (red.): *Fields Virology*. PA: Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia 2007, 1975-1977.
22. Saegerman C., Berkvens D., Mellor P. S.: Bluetongue epidemiology in the European Union. *Emerging Infect. Dis.* 2008, 14, 539-544.
23. Singh K. P., Maan S., Samuel A. R., Rao S., Meyer A., Mertens P. P.: Phylogenetic analysis of bluetongue virus genome segment 6 (encoding VP5) from different serotypes. *Vet. Ital.* 2005, 40, 479-483.
24. Stauber N., Martinez-Costas J., Sutton G., Monastyrskaya K., Roy P.: Bluetongue virus VP6 protein binds ATP and exhibits an RNA-dependent ATPase function and a helicase activity that catalyse the unwinding of double stranded RNA. *J. Virol.* 1997, 71, 7220-7226.
25. Sutton G., Grimes J. M., Stuart D. I., Roy P.: Bluetongue virus VP4 is an RNA-capping assembly line. *Nat. Struci. Mol. Biol.* 2007, 14, 449-451.
26. Tan B. H., Nason E., Stauber N., Jiang W., Monastyrskaya K., Roy P.: RGD tripeptide of bluetongue virus VP7 protein is responsible for core attachment to *Culicoides* wells. *J. Virol.* 2001, 75, 3937-3947.
27. Wijaszka T., Truszczyński M.: Występowanie na świecie w latach 2006-2007 ważnych epizootii, według OIE. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 1270-1272.

Adres autora: doc. dr hab. Wiesław Niedbalski, ul. Zielona 48/4, 98-220 Zduńska Wola; e-mail: wieslaw@piwzp.invar.net.pl