

## PESTIVIREN

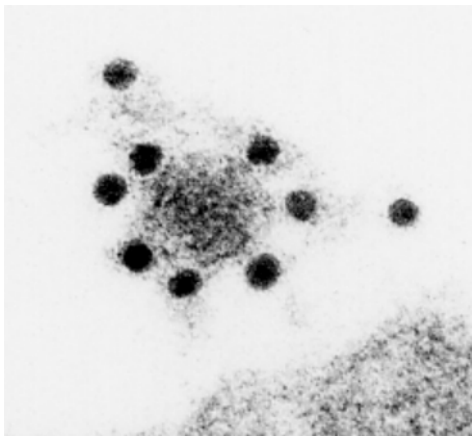
### Einleitung

Krankheiten, die von Pestiviren ausgelöst werden, zählen weltweit zu den wichtigsten Seuchen landwirtschaftlicher Nutztiere. Mit großem Medieninteresse wurden in der jüngeren Vergangenheit die immer wieder in unregelmäßigen Abständen zu verzeichnenden Ausbrüche der klassischen Schweinepest bedacht, die für enorme Ausfälle in der Landwirtschaft verantwortlich waren. In der Öffentlichkeit weniger beachtet, aber wirtschaftlich nicht minder bedeutend, sind die Schäden, die durch Pestiviren in den Rinderbeständen verursacht werden. Dabei sind vor allem Probleme bei der Belegung, Trächtigkeitsstörungen und Ausbrüche der tödlich verlaufenden Schleimhautrekrankung bei persistent infizierten Kälbern zu verzeichnen. Neue Gefahren drohen zudem durch eine bisher vor allem in Amerika aufgetretene schwere hämorrhagische Krankheitsform.

Auslöser der beschriebenen Krankheiten sind das Schweinepestvirus (classical swine fever virus, CSFV) bzw. das bovine virale Diarrhöe Virus ('bovine viral diarrhea virus', BVDV), die aufgrund ihrer Genomorganisation und Strategie der Genexpression zusammen mit dem 'border disease' Virus (BDV) des Schafes in das Genus *Pestivirus* der Familie der Flaviviren eingruppiert werden (3). Diese Familie umfasst neben den Pestiviren die Genera *Flavivirus* und *Hepacivirus*.

### Die Molekularbiologie von Pestiviren

Pestiviruspartikel sind von einer Lipidmembran umhüllt und besitzen einen Durchmesser von 40-60 nm (Abb. 1) (10). Das vermutlich ikosaedrische Kapsid, das die virale Erbsubstanz umgibt, hat einen Durchmesser von etwa 30 nm. Aufgrund ihrer lipidhaltigen Hülle können Pestiviren durch Substanzen wie Chloroform, Ether und Detergenzien inaktiviert werden. Eine Abnahme bzw. Zerstörung der Infektiosität kann weiterhin durch proteolytische Enzyme, Hitze, UV-Bestrahlung und niedrige pH-Werte erzielt werden (2).



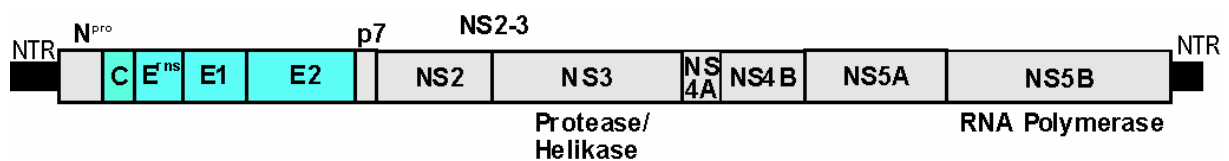
**Abb. 1**

Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Schweinepestvirus.

Das Viruspartikel wurde mit Gold-markierten Antikörpern gegen das E<sup>ms</sup> Protein markiert.

(Bild: F. Weiland, FLI Tübingen)

Das Genom der Pestiviren besteht aus einer einzelsträngigen RNA positiver Polarität, die im Regelfall eine Länge von 12,3 kb aufweist und am 3'-Ende nicht polyadenyliert ist (10). Das Genom enthält einen langen offenen Leserahmen ('open reading frame', ORF), der von nicht kodierenden Sequenzen flankiert ist und für ein Protein von etwa 4000 Aminosäuren kodiert (Abb. 2). Die genomische RNA dient bei Pestiviren direkt als Boten RNA ('messenger' RNA, mRNA). Am 5'-Ende der RNA fehlt die für die meisten zellulären mRNAs typische „cap-Struktur“, die eine wichtige Rolle bei der Translation der RNA in eine Proteinsequenz spielt (1). Die Initiation der Translation wird durch einen Virus spezifischen Mechanismus über eine interne Ribosomenbindungsstelle ('internal ribosome entry site', IRES) in der 5'-nichtkodierenden Region vermittelt (14,15).



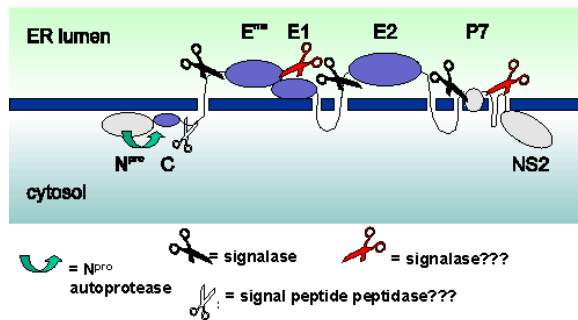
**Abb.2**

Genomorganisation eines Pestivirus

Die Namen der kodierten Proteine sind angegeben. Unter der Zeichnung sind die Funktionen einzelner Enzyme aufgeführt. Schwarze Balken: nichtkodierende RNA (NTR=nicht translatierte Region); blaue Balken: Strukturproteingene; graue Balken: Nichtstrukturproteingene.

Produkt der Translation ist ein Polyprotein, das durch wirtszell- und viruskodierte Proteasen ko- und posttranslational prozessiert wird, wodurch die reifen Virusproteine entstehen (Abb. 3). Am Aminoterminus des Polyproteins ist eine als N<sup>pro</sup> bezeichnete Protease lokalisiert. Sie stellt ein Nichtstrukturprotein dar, das sich autokatalytisch vom Polyprotein abspaltet und damit den N-Terminus des nachfolgenden Kapsidproteins (C) erzeugt (14,17,20,25). Auf das Kapsidprotein folgt eine Signalsequenz, die die Translokation der viralen Strukturglykoproteine E<sup>ms</sup>, E1 und E2 in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER), eines membranumhüllten Tunnelsystems der Zelle, das u.a. wichtige Funktionen beim Ausschleusen von Material aus der Zelle hat, initiiert. Dort erfolgt die Prozessierung dieses Teils des Polyproteins durch zelluläre Proteasen (Abb. 3). Die Spaltungen zwischen C und E<sup>ms</sup> sowie E1 und E2 werden durch zelluläre Enzyme, sog. Signalpeptidasen, vermittelt (18). Ob derartige Proteasen auch für die Spaltung zwischen E<sup>ms</sup> und E1 verantwortlich sind, ist noch nicht genau geklärt. Alle drei Glykoproteine bilden in infizierten Zellen und Virionen über Disulfidbrücken verbundene Dimere. Neben E<sup>ms</sup>-Homodimeren wurden E1/E2-Heterodimere sowie E2-Homodimere nachgewiesen (22).

Prozessierung der aminoterminalen Region des Polyproteins



Prozessierung der carboxyterminalen Region des Polyproteins

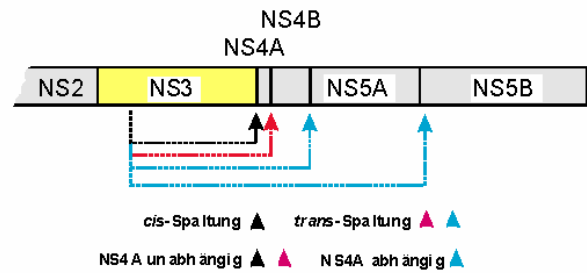


Abb. 3

Prozessierung des Pestivirus Polyproteins

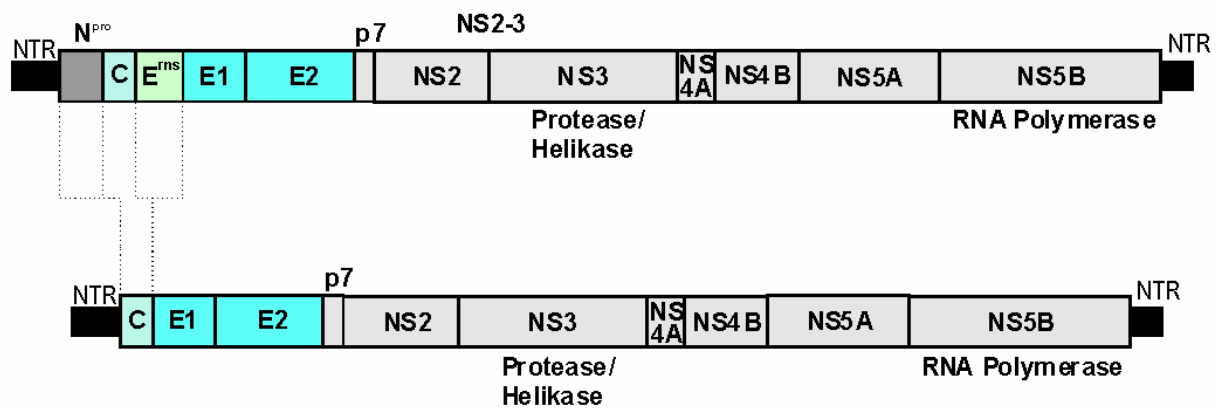
Für die aminoterminalen Region sind die verschiedenen (vermutlich) aktiven Proteasen und die Lokalisation der Proteine in der Zelle (Zytosol=Zytoplasma) schematisch dargestellt. Für die carboxyterminale Region ist angedeutet, welche der Prozessierungsschritte die NS3 Protease *in trans* bzw. *in cis* ausführt und für welche NS4A als Kofaktor erforderlich ist.

Die hinteren (C-terminalen) zwei Drittel des Genoms kodieren für die restlichen Nichtstrukturproteine. Es handelt sich um für RNA Viren typische Enzyme wie Protease, Helikase und RNA Polymerase, sowie eine Reihe von Proteinen mit bisher unbekannter Funktion, die für die Proteinreifung und Vermehrung der viralen RNA benötigt werden (10). Die Prozessierung dieses Teils des Polyproteins erfolgt durch die virale NS3 Protease (Abb. 3) (21,26).

Die Spaltung zwischen NS2 und NS3 stellt eine Besonderheit dar. Sie ist direkt mit dem Auftreten zytopathogener bzw. nicht zytopathogener Pestiviren verbunden und wird von unterschiedlichen Proteasen ausgeführt (7,8,13).

Pestiviren stellen die nächsten Verwandten der humanen Hepatitis C Viren (HCV). Die molekularbiologische Verwandtschaft zwischen den beiden Viren geht so weit, dass molekulare Mechanismen der viralen Replikation und Größen, generelle biochemische Charakteristika und bisher bekannte Funktionen von Proteinen verblüffend ähnlich sind, so dass Pestiviren in verschiedenen Bereichen als Modellsysteme für die in Gewebekulturzellen bisher nicht gut vermehrbaren, humanmedizinisch sehr bedeutenden Hepatitis C Viren dienen. Ein direkter Vergleich der Genomorganisationen beider Viren zeigt neben der großen Ähnlichkeit aber zwei besonders auffällige Unterschiede (Abb. 4). Am 5' Ende des ORF der Pestiviren wird mit dem N<sup>pro</sup> ein Nichtstrukturprotein kodiert, das beim HCV fehlt. Zudem verfügen Pestiviren als einzige Vertreter der Familie *Flaviviridae* über drei Strukturglykoproteine. Ein Vergleich biochemischer und funktioneller Eigenschaften dieser Polypeptide mit denen der Membranproteine E1 und E2 des HCV zeigt, dass sich die E1 und E2 Proteine entsprechen, während ein Pendant für das E<sup>ms</sup> Protein beim HCV fehlt.

# Pestivirusgenom



## Genom des HCV

**Abb. 4**

Vergleich der Genomorganisationen von Pesti- und Hepaciviren

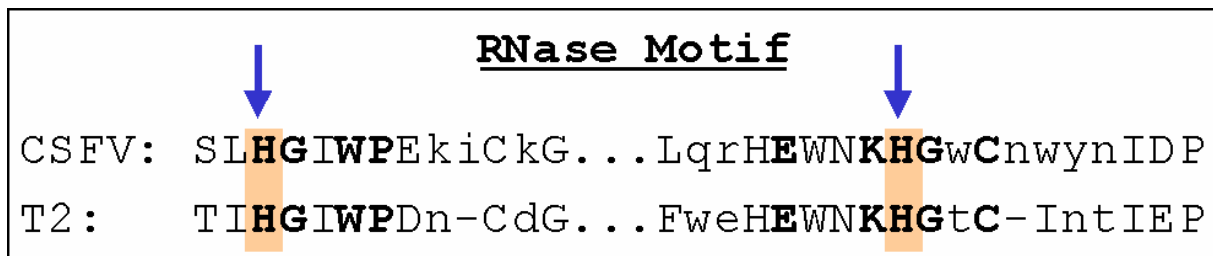
Das Fehlen ganzer Gene im Genom verwandter Viren kann ein Hinweis darauf sein, dass die fraglichen Sequenzen zusätzlich durch Rekombination in die RNA des Virus eingeführt wurden. Die von solchen Sequenzen kodierten Genprodukte können akzessorische Funktion besitzen und müssen an der Replikation des Virus nicht beteiligt sein. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass es sich beim N<sup>pro</sup> Gen der Pestiviren um eine nicht essentielle Sequenz handelt. Neuere Arbeiten haben Hinweise darauf ergeben, dass das kodierte Protein eine biochemisch gesehen ungewöhnliche Protease darstellt (17). Die Expression des N<sup>pro</sup> in infizierten Zellen scheint mit dem ‚Virusabwehrprogramm‘ der infizierten Zellen zu interferieren und somit die Vermehrung der Erreger zu begünstigen (16). Der Mechanismus, auf dem dieser Effekt beruht, ist bisher noch nicht verstanden.

Im Gegensatz zum N<sup>pro</sup> stellt das E<sup>ms</sup> ein essentielles Protein dar. Es ist schon länger bekannt, dass das E<sup>ms</sup> einen wesentlichen Bestandteil der Virushülle darstellt (Abb. 1). Antikörper, die gegen dieses Protein gerichtet sind, können die Infektion von Zellen verhindern und eine Deletion der E<sup>ms</sup>-kodierenden Sequenz aus dem Genom eines Pestivirus verhindert die Bildung infektiöser Partikel (5,6,23,24).

Das E<sup>ms</sup> besitzt eine ganze Reihe auffälliger bzw. ungewöhnlicher Eigenschaften. Das reife E<sup>ms</sup> besteht zu beinahe 50% aus Kohlenhydraten, die als sog. Seitenketten während der Proteinreifung an die Polypeptidkette gebunden werden. Dem Protein fehlt eine typische Sequenz, die für seine Integration in Membranen sorgen könnte. Trotzdem ist E<sup>ms</sup> offensichtlich stabil mit der Virushülle verbunden, so dass ein bisher unbekannter Mechanismus für seine Verankerung sorgen muss. Mit diesem neuartigen Verankerungsmechanismus ist vermutlich die Tatsache korreliert, dass ein definierter Teil

des in einer infizierten Zelle gebildeten E<sup>ms</sup> in den Überstand abgegeben wird; dies ist höchstwahrscheinlich der Grund dafür, dass E<sup>ms</sup> im Serum eines infizierten Tieres nachgewiesen werden kann (18). Das carboxyterminale Ende des Proteins enthält eine Sequenz, die in der Lage ist, E<sup>ms</sup> oder auch fremde Proteine von außen durch eine Zellmembran zu schleusen (9).

Die für ein Strukturglykoprotein wohl ungewöhnlichste Eigenschaft des E<sup>ms</sup> ist aber seine enzymatische Aktivität. Erste Hinweise auf eine mögliche Enzymfunktion wurden im Zusammenhang mit Sequenzstudien erhalten. Dabei fiel auf, dass die E<sup>ms</sup> Sequenz ein Motiv enthält, das typische Charakteristika von Sequenzen aufweist, die im aktiven Zentrum einer Familie von RNasen zu finden sind (Abb. 5). Tests mit hoch gereinigtem Protein bestätigten dann, dass E<sup>ms</sup> tatsächlich eine RNase ist (4,19).



**Abb. 5**

Vergleich eines Teils der E<sup>ms</sup> Sequenz des CSFV mit der Sequenz des aktiven Zentrum der bekannten RNase T2. Die zwei katalytisch aktiven Histidinreste sind hervorgehoben.

Pestiviren sind die ersten und bisher einzigen RNA Viren, deren Genom für eine RNase kodiert. Es ist damit offensichtlich, dass eine RNase Aktivität nicht zum üblichen Enzymrepertoire eines solchen Virus gehört. Die genaue Funktion der RNase ist bisher nicht geklärt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Aktivität des E<sup>ms</sup> für die Virusreplikation nicht essentiell ist. RNase negative Pestiviren erwiesen sich als attenuiert (11,12).

#### Reference List

1. **Brock, K. V., R. Deng, and S. M. Riblet.** 1992. Nucleotide sequencing of 5' and 3' termini of bovine viral diarrhea virus by RNA ligation and PCR. *J. Virol. Methods* **38**:39-46.
2. **Depner, K., T. Bauer, and B. Liess.** 1992. Thermal and pH stability of pestiviruses. *Rev. Sci. Tech.* **11**:885-893.
3. **Heinz, F. X., M. S. Collett, R. H. Purcell, E. A. Gould, C. R. Howard, M. Houghton, J. M. Moormann, C. M. Rice, and H.-J. Thiel.** 2000. Family Flaviviridae, p. 859-878. *In*

R. v. M.H.V., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner (ed.), *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, USA.

4. **Hulst, M. M., G. Himes, E. Newbigin, and R. J. M. Moormann.** 1994. Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: expression in insect cells and identification as a ribonuclease. *Virology* **200**:558-565.
5. **Hulst, M. M. and R. J. Moormann.** 1997. Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E(rns) and E2 of classical swine fever virus: E(rns) and E2 interact with different receptors. *J. Gen. Virol.* **78 ( Pt 11)**:2779-2787.
6. **Hulst, M. M. and R. J. Moormann.** 2001. Erns protein of pestiviruses. *Methods Enzymol.* **342**:431-440.
7. **Kümmerer, B. M., N. Tautz, P. Becher, H. Thiel, and G. Meyers.** 2000. The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Vet Microbiol* **77**:117-28.
8. **Lackner, T., A. Muller, A. Pankraz, P. Becher, H. J. Thiel, A. E. Gorbalenya, and N. Tautz.** 2004. Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *J. Virol.* **78**:10765-10775.
9. **Langedijk, J. P.** 2002. Translocation activity of C-terminal domain of pestivirus Erns and ribotoxin L3 loop. *J Biol Chem* **277**:5308-14.
10. **Lindenbach, B. D. and C. M. Rice.** 2001. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication, p. 991-1042. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, vol. 1. Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia, New York.
11. **Meyer, C., M. Von Freyburg, K. Elbers, and G. Meyers.** 2002. Recovery of virulent and RNase-negative attenuated type 2 bovine viral diarrhea viruses from infectious cDNA clones. *J. Virol.* **76**:8494-8503.
12. **Meyers, G., A. Saalmüller, and M. Büttner.** 1999. Mutations abrogating the RNase activity in glycoprotein e(rns) of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation. *J Virol* **73**:10224-35.
13. **Meyers, G. and H.-J. Thiel.** 1996. Molecular characterization of pestiviruses. *Advances in virus research* **47**:53-117.
14. **Poole, T. L., C. Wang, R. A. Popp, L. N. D. Potgieter, A. Siddiqui, and M. S. Collett.** 1995. Pestivirus translation occurs by internal ribosome entry. *Virology* **206**:750-754.
15. **Rijnbrand, R., T. v.d.Straaten, P. A. v.Rijn, W. J. M. Spaan, and P. J. Breedenbeek.** 1997. Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. *J Virol* **71**:451-457.
16. **Ruggli, N., J. D. Tratschin, M. Schweizer, K. C. McCullough, M. A. Hofmann, and A. Summerfield.** 2003. Classical swine fever virus interferes with cellular antiviral defense: evidence for a novel function of N(pro). *J. Virol.* **77**:7645-7654.
17. **Rümenapf, T., R. Stark, M. Heimann, and H. J. Thiel.** 1998. N-terminal protease of pestiviruses: identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis. *J Virol* **72**:2544-7.

18. **Rümenapf, T., G. Unger, J. H. Strauss, and H.-J. Thiel.** 1993. Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J Virol* **67**:3288-3295.
19. **Schneider, R., G. Unger, R. Stark, E. Schneider-Scherzer, and H.-J. Thiel.** 1993. Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science* **261**:1169-1171.
20. **Stark, R., G. Meyers, T. Rümenapf, and H.-J. Thiel.** 1993. Processing of pestivirus polyprotein: Cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J Virol* **67**:7088-7095.
21. **Tautz, N., K. Elbers, D. Stoll, G. Meyers, and H.-J. Thiel.** 1997. Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. *J Virol* **71**:5415-22.
22. **Thiel, H.-J., R. Stark, E. Weiland, T. Rümenapf, and G. Meyers.** 1991. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol* **65**:4705-4712.
23. **Weiland, E., R. Ahl, R. Stark, F. Weiland, and H.-J. Thiel.** 1992. A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J Virol* **66**:3677-3682.
24. **Widjoatmodjo, M. N., H. G. van Gennip, A. Bouma, P. A. van Rijn, and R. J. Moormann.** 2000. Classical swine fever virus E(rns) deletion mutants: trans-complementation and potential use as nontransmissible, modified, live-attenuated marker vaccines. *J. Virol.* **74**:2973-2980.
25. **Wiskerchen, M., S. K. Belzer, and M. S. Collett.** 1991. Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J Virol* **65**:4508-4514.
26. **Xu, J., E. Mendez, P. R. Caron, C. Lin, M. A. Murcko, M. S. Collett, and C. M. Rice.** 1997. Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J Virol* **71**:5312-5322.