

CALICIVIREN

Die Familie *Caliciviridae* umfasst derzeit 4 Genera, in die verschiedene Krankheitserreger von Mensch und Tier aufgrund charakteristischer morphologischer und molekularbiologischer Eigenschaften eingruppiert sind (1). Es gibt zudem Hinweise, dass weitere Caliciviren vorkommen, die nicht direkt mit Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden können (9). Die Tatsache, dass nach einem Wirtswechsel eines Calicivirus' von einer marinen Spezies auf das Schwein eine hochgefährliche Krankheit zu beobachten war (10), und die Erkenntnis, dass der Erreger der tödlichen hämorrhagischen Kaninchenseuche ('rabbit hemorrhagic disease virus' RHDV) vermutlich auf ungeklärte Weise aus einem harmlosen Darmparasiten entstanden ist (9), machen diese wenig untersuchte Virusfamilie unter (veterinär)medizinischen Aspekten bedeutend. Darüber hinaus besitzen Caliciviren interessante molekularbiologische Eigenschaften, die bisher nur unzureichend erforscht sind.

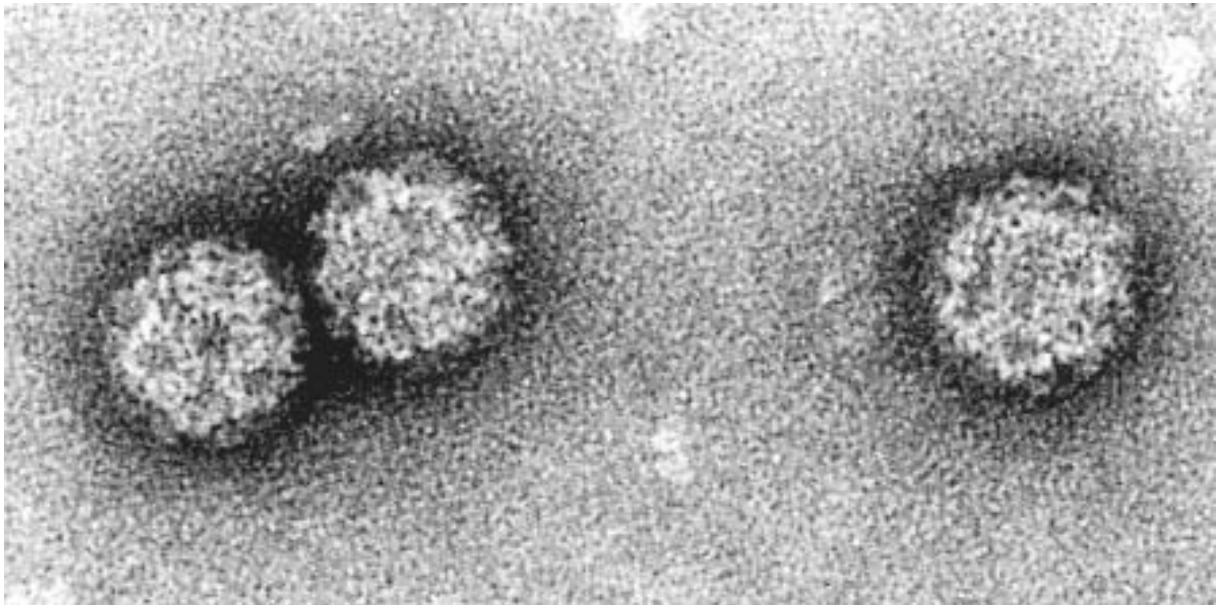


Abb. 1

Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Felinen Calicivirus

(Bild: F. Weiland, FLI Tübingen)

Caliciviren wurden ursprünglich zu den Picornaviren gezählt, zu denen auch bekannte Erreger wie das humane Poliovirus und das Maul- und Klauenseuchevirus gehören. Grund dafür waren vornehmlich morphologische Ähnlichkeiten und das ca. 7,5 kb große einzelsträngige RNA Genom positiver Polarität, das am 5' Ende ein als VPg bezeichnetes virales Protein trägt und am 3' Ende polyadenyliert ist. Die weitere, insbesondere molekularbiologische Analyse dieser Viren hat aber gravierende Unterschiede herausgearbeitet und zur Gründung der Familie Caliciviridae geführt.

Ein zentraler Unterschied zwischen Picorna- und Caliciviren betrifft die generelle Organisation des Genoms und die Strategie der Genexpression. Während bei Picornaviren die 4 Kapsidproteine vom 5'-terminalen Bereich der viralen RNA kodiert werden (11), sind bei Caliciviren die entsprechenden Gene für die 2 Kapsidproteine am 3' Ende des Genoms zu finden (1,2) (Abb. 2). Dabei ist zu bemerken, dass das Calicivirus Partikel aus einem Hauptkapsidprotein von ca. 60 kDa besteht (VP60), das spontan zu Virus-ähnlichen Partikeln ('virus-like particles', VLP) aus 180 Untereinheiten assembliert, ohne dass das zweite, minore Kapsidprotein vorhanden sein muss (12-17). Dagegen sind die Kapside von Picornaviren komplizierter aufgebaut und beinhalten gleiche stöchiometrische Mengen der Proteine VP1-4 (11). Wie andere Plusstrang RNA Viren mit vergleichbarer Genomorganisation nutzen Caliciviren eine subgenomische mRNA zur Expression der Strukturproteine, während Picornaviren ausschließlich RNA genomischer Länge bilden. Neben diesen fundamentalen Unterschieden weisen die Vertreter der beiden Virusfamilien aber auch überraschende Übereinstimmungen auf, die sich vor allem in der Anordnung und (prognostizierten) Funktion der Nichtstrukturproteine zeigen. So findet sich bei beiden Viren am 3' Ende des fraglichen Genombereichs ein geschlossener Block, der für VPg, Protease und Polymerase kodiert. Die Identität dieser Proteine und ihre enzymatische Funktion wurde bei den Caliciviren zuerst für das RHDV gezeigt (3-5,19-28). In dem Bereich des Polyproteins, der dem zentralen Block vorgelagert ist, findet sich bei Vertretern beider Familien ein Protein, das dNTPase und (vermutlich) Helikaseaktivität besitzt, wobei enzymatische Analysen bei den Caliciviren lediglich für das RHDV-Protein und ein Translationsprodukt des Norwalk Virus durchgeführt wurden (20,27). Das RHDV war auch der erste Vertreter der Familie für den eine lückenlose Genomkarte mit allen kodierten Protein vorlag (3,4,5). Mittlerweile liegen detailliertere Vorstellungen zur Genomorganisation auch für das Southhampton Virus (SV) und das feline Calicivirus (FCV) vor (28, 42).

Comparison of genome organisations of RHDV and Poliovirus (PV)

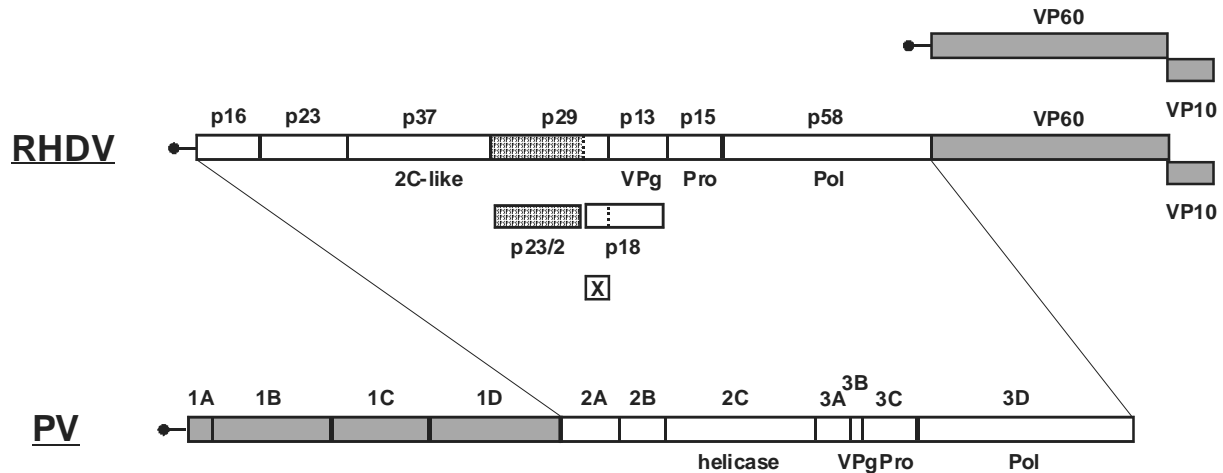


Abb. 2 Vergleich der Genomorganisationen des RHDV und des Poliovirus (PV).

Regionen, die für die viralen Strukturproteine kodieren sind als graue Balken dargestellt, während weiße Balken die Nichtstrukturproteine darstellen. Por: Protease, Pol: RNA abhängige Polymerase.

Bei einer formalen Gegenüberstellung der Proteine des RHDV und denen des Poliovirus zeigen sich über die o.g. Entsprechungen hinaus weitere Ähnlichkeiten, die die Zahl und ungefähre Größe der einzelnen Proteine sowie die Verteilung von hydrophoben bzw. hydrophilen Bereichen innerhalb der verschiedenen Polypeptide betrifft. Auffällig ist aber, dass beim RHDV zwischen der (mutmaßlichen) Helicase und einem kleinen hydrophoben Protein, das dem VPg vorgelagert ist, ein ca. 23 kDa großes Protein lokalisiert ist, zu dem es beim Poliovirus keine Entsprechung gibt (5).

Das Leseraster #1, das für die Nichtstrukturproteine kodiert, wird in ein Polyprotein translatiert, das anschließend in die einzelnen Virusproteine prozessiert wird (1,2) (Abb. 3). Genauer untersucht wurde dieser Prozess bisher vor allem für das RHDV, das SV und für das FCV (5,23,28,29,42). Die vorliegenden Daten sprechen dafür, dass alle erforderlichen Spaltungen von der intrinsischen viralen Protease vorgenommen werden. Arbeiten zur viralen Protease, die N-terminale Sequenzierung von Spaltprodukten und Mutagenesestudien an prognostizierten Spaltsequenzen erlaubten es, die Spaltstellen im viralen Polyprotein zu lokalisieren (5, 18,19,23,28,30,31,42).

Genome Organisation and Polyprotein Processing of RHDV

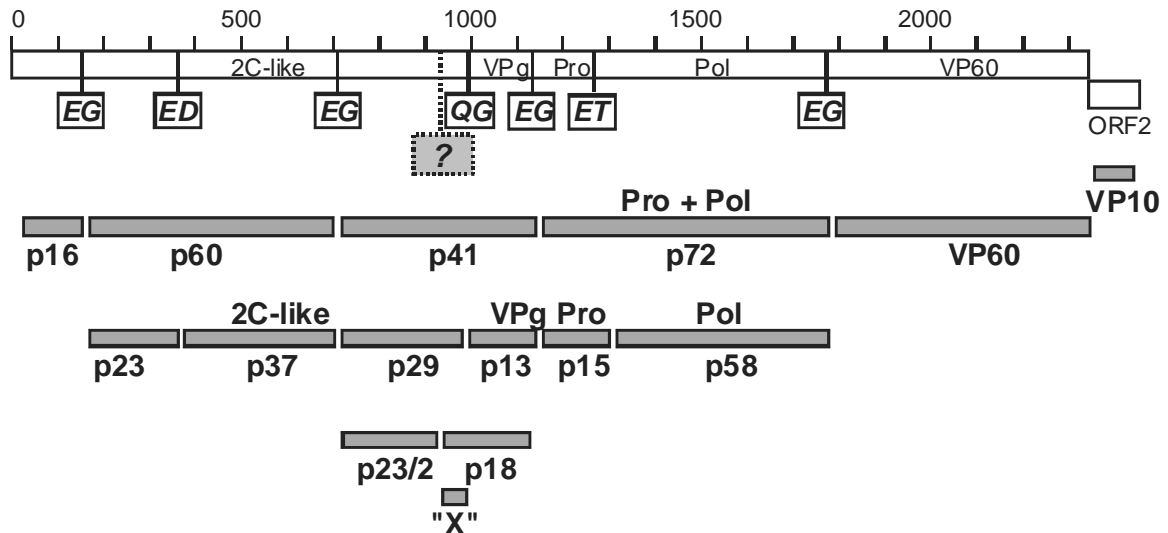


Abb. 3: Detaillierte Genomorganisation des RHDV mit Angabe Dipeptide an den Schnittstellen im kodierten Polyprotein

Im Gegensatz zu Picornaviren transkribieren Caliciviren eine subgenomische mRNA, die der Expression der Strukturproteine dient (s. Abb. 2). Diese etwa 2,4 kb lange RNA ist 3' coterminal zum viralen Genom und erstreckt sich beim RHDV über die Region des ORF#1, die für das Hauptkapsidprotein VP60 kodiert sowie den 3' terminalen ORF#2, der in das minore Kapsidprotein VP10 translatiert wird (33). Beim FCV und anderen Vesiviren deckt die mRNA einen entsprechenden Bereich des Genoms ab, der aber in zwei separate ORFs aufgeteilt ist, wobei der ORF#2 für einen Vorläufer des Hauptkapsidproteins kodiert, aus dem das VP60 und ein ca. 15 kDa großes Protein unbekannter Funktion durch Proteolyse freigesetzt werden, während der 3' terminal lokalisierte ORF#3 dem ORF#2 beim RHDV entspricht (34-36).

Bisher ist nicht bekannt, nach welchem Mechanismus die subgenomische mRNA exprimiert wird. Für das RHDV wurde das 5' Ende der RNA analysiert (33). Demnach startet die mRNA mit einer Sequenz, die hohe Homologie zum 5' Ende des Genoms zeigt. Auch bei anderen Caliciviren findet sich in der fraglichen Region eine Sequenz mit Ähnlichkeiten zum Anfang des Genoms, wobei die Übereinstimmungen z.B. beim FCV deutlich weniger ausgeprägt sind (34). Die subgenomische mRNA von Caliciviren besitzt einige ungewöhnliche Eigenschaften. So ist sie wie das Genom mit einem VPg versehen, das wie bei anderen Viren kovalent an das 5' Ende der jeweiligen RNA gebunden ist (26,33). Im Gegensatz zu den Picornaviren, bei denen das VPg nur aus wenigen Aminosäuren besteht, findet sich bei Caliciviren ein Protein von ca.

12 bis 22 kDa (3,24-26,33). Dieser Größenunterschied sollte auch funktionell bedeutend sein und tatsächlich zeichnet sich ab, dass das Calicivirus-VPg eine Rolle bei der Translationsinitiation besitzt (26,37). Neben dieser Funktion könnte die Bindung des VPg an die mRNA auch darauf hindeuten, dass wie bei den Picornaviren beschrieben (38) das VPg eine Funktion bei der Transkription erfüllt, so dass virale RNA prinzipiell nur mit VPg gebildet werden könnte.

Eine weitere auffällige Eigenschaft der subgenomischen mRNA ist, dass sie offensichtlich in Virusartikeln verpackt wird (33) und es zudem Hinweise gibt, dass die mRNA in der infizierten Zelle separat repliziert wird, denn es findet sich minussträngige mRNA (39). Damit verhält sich die subgenomische RNA in mehreren Beziehungen eher wie ein Genomsegment als wie eine normale mRNA. Bisher ist allerdings völlig unklar, ob diese Besonderheiten funktionell bedeutsam sind. Zudem ist nicht bekannt, warum beim RHDV das Hauptkapsidprotein VP60 auch als Teil des ORF#1 ausgehend von der genomischen RNA exprimiert wird und dann durch proteolytische Spaltung freigesetzt wird, während das entsprechende Protein beim FCV im separaten ORF#2 kodiert wird.

Das 3' terminale Leseraster, das in allen Calicivirusgenomen gefunden wurde, besitzt die Kapazität für ein kleines basisches Protein von ca. 10 bis 22 kDa zu kodieren (1,2,3,6,7,8). Beim RHDV gelang erstmals der Nachweis, dass es sich bei diesem als VP10 bezeichneten Protein um ein Strukturprotein handelt, das aber im Vergleich mit dem VP60 in substöchiometrischer Menge im Viruspartikel vorliegt (3 und Meyers unveröffentlicht). Der Mechanismus, der zur Expression des VP10 führt, ist bisher im Detail noch ungeklärt. Unsere Arbeiten deuten aber darauf hin, dass die Expression dieses Proteins auf einer neuen Form des Translations Stop/Start Mechanismus basiert, bei der die Stop und Start Signale in einer Region lokalisiert sind, die zudem die Eigenschaft hat, Rasterverschiebungen bei der Translation zu induzieren (40). Vermutlich wird mit dem besonderen Mechanismus der Translationsinitiation erreicht, dass VP60 und VP10 in einem definierten Mengenverhältnis gebildet werden

Wie bereits oben beschrieben lassen sich viele Caliciviren nicht in einfachen Gewebekultursystemen vermehren. Dazu gehören sowohl die Vertreter des Genus Lagovirus (RHDV und der verwandte Erreger des 'Europäischen Hasensterbens', EBHSV) als auch die humanen Caliciviren. Deshalb muss für weitergehende Studien auf transiente Expressionssysteme zurückgegriffen werden (5). Im Gegensatz dazu gibt es hervorragende Gewebekultursysteme für alle Vertreter des Genus Vesivirus, in das auch das FCV eingegliedert ist. Damit sind Vesiviren z.Zt. am besten für Studien zur Replikation, deren Regulation und zur Funktion von *cis*- und *trans*-aktiven Strukturen bzw. Molekülen geeignet. Es ist deshalb auch nicht verwunderlich, dass es für das FCV als dem am besten untersuchten Vertreter dieses Genus' gelungen ist, eine infektiöse cDNA Klone zu etablieren, von dem

ausgehend nach Transfektion einer durch *in vitro* Transkription synthetisierten RNA infektiöses Virus erhalten werden kann (39,41).

Referenzen:

1. Green, K.Y., Ando, T., Balayan, M.S., Clarke, I.N., Estes, M.K., Matson, D.O., Nakata, S., Neill, J.D., Studdert, M.J., and Thiel, H.-J. (2000). Family Caliciviridae In: Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., and Bishop, D.H.L. Virus Taxonomy. pp 725-734. Academic Press, New York.
2. Clarke, I.N., and Lambden, P.R. (1997). The molecular biology of caliciviruses. J. Gen. Virol. **78**,291-301.
3. Wirblich, C., Thiel, H.-J., and Meyers, G. (1996). Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from *in vitro* translation studies. J. Virol. **70**, 7974-7983.
4. König, M., Thiel, H.-J., and Meyers, G. (1998). Detection of viral proteins after infection of cultured hepatocytes with rabbit hemorrhagic disease virus. J. Virol. **72**, 4492-4497.
5. Meyers, G., Wirblich, C., Thiel, H.-J., and Thumfart, J.O. (2000). Rabbit hemorrhagic disease virus: genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs. Virology **276**, 349-363.
6. Herbert, T.P., Brierley, I., and Brown, T.D.K. (1996). Detection of the ORF3 polypeptide of feline calicivirus in infected cells and evidence for its expression from a single, functionally bicistronic, subgenomic RNA. J. Gen. Virol. **77**, 123-127.
7. Glass, P.J., White, L.J., Ball, J.M., Leparac-Goffart, I., Hardy, M.E., and Estes, M.K. (2000) Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. J. Virol. **74**, 6581-6591.
8. Sosnotsev S.S., and Green, K.Y. (2000) Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. Virology **277**, 193-203.
9. Capucci, L., Fusi, P., Lavazza, A., Pacciarini, M.L., and Rossi, C. (1996). Detection and Characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. J. Virol. **70**, 8614-8623.
10. Smith, A.W., Skilling, D.E., Cherry, N., Mead, J.H., and Matson, D.O. (1998). Calicivirus Emergence from Ocean Reservoirs: zoonotic and interspecies movements. Emerg Infect Dis. **4**,13-20.
11. Rueckert, R.R. (1996). Picornaviridae: the viruses and their replication. In Fields Virology, eds. Fields, B.N., Knipe, D.M., & Howley, P.M. (Lippincott-Raven, Philadelphia), pp. 609-647.
12. Prasad, B.V., Hardy, M.E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M.G., and Estes, M.K. (1999). X-ray crystallographic structure of the norwalk virus capsid. Science **286**, 287-290.
13. Prasad, B.V., Rothnagel, R., Jiang, X., and Estes, M.K. (1994). Three-dimensional structure of the baculovirus-expressed norwalk virus capsids. J.Virol. **68**, 5117-5125.
14. Laurent S, Vautherot, J.F., Madelaine, M.F., Le Gall, G., and Rasschaert, D. (1994). Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in

- baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection. *J. Virol.* **68**, 6794-6798.
15. Sibilía M., Boniotti, M.B., Angoscini, P., Capucci, L., and Rossi, C. (1995). Two independent pathways of expression lead to self-assembly of the rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J. Virol.* **69**, 5812-5815.
 16. Jiang, X., Wang, M., Graham, D.Y., and Estes, M.K. (1992). Expression, self-assembly, and antigenicity of norwalk virus capsid protein. *J. Virol.* **66**, 6527-6532.
 17. Geissler, K., Schneider, K., Fleuchaus, A., Parrish, C.R., Sutter, G., and Truyen, U. (1999). Feline calicivirus capsid protein expression and capsid assembly in cultured feline cells. *J. Virol.* **73**, 834-838.
 18. Wirblich, C., Sibilía, M., Boniotti, M.B., Rossi, C., Thiel, H.-J., and Meyers, G. (1995). 3C-like protease of rabbit hemorrhagic disease virus: identification of cleavage sites in the ORF1 polyprotein and analysis of cleavage specificity. *J. Virol.* **69**, 7159-7168.
 19. Boniotti, B., Wirblich, C., Sibilía, M., Meyers, G., Thiel, H.-J., and Rossi, C. (1994). Identification and characterization of a 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus. *J. Virol.* **68**, 6487-6495.
 20. Marin, M.S., Casais, R., Alonso, J.M., and Parra, F. (2000). ATP binding and ATPase activities associated with recombinant rabbit hemorrhagic disease virus 2C-like polypeptide. *J. Virol.* **74**, 10846-10851.
 21. Vasquez, A.L., Alonso, J.M., and Parra, F. (2000). Mutation analysis of the GDD sequence motif of a calicivirus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* **74**, 3888-3891.
 22. Wei, L., Huhn, J.S., Mory, A., Pathak, H.B., Sosnovtsev, S.V., Green, K.Y., and Cameron, C.E. (2001). Proteinase-Polymerase precursor as the active form of feline calicivirus RNA polymerase. *J. Virol.* **75**, 1211-1219.
 23. Sosnovtseva S.A., Sosnovtsev, S.V., and Green, K.Y. (1999). Mapping of the feline calicivirus proteinase responsible for autocatalytic processing of the nonstructural polyprotein and identification of a stable proteinase-polymerase precursor protein. *J. Virol.* **73**, 6626-6633.
 24. Dunham, D.M., Jiang, X., Berke, T., Smith, A.W., and Matson, D.O. (1998) Genomic mapping of a calicivirus VPg. *Arch. Virol.* **143**, 2421-2430.
 25. Schaffer, F.L., Ehresmann, D.W., Fretz, M.K., and Soergel, M.E. (1980). A protein, VPg, covalently linked to 36S calicivirus RNA. *J. Gen. Virol.*, **47**, 215-220.
 26. Herbert, T.P., Brierley, I., Brown, T.D. (1997) Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *J. Gen. Virol.* **78**, 1033-1040.
 27. Pfister, T., and Wimmer, E. (2001). Polypeptide p41 of a Norwalk-like virus is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase. *J. Virol.* **75**, 1611-1619.
 28. Clarke, I.N., and Lambden, P.R. (2000). Organization and expression of calicivirus genes. *J. Infect. Dis. Suppl.* **2**, 309-316.
 29. Sosnovtsev SV, Sosnovtseva SA, Green KY. (1998). Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase. *J. Virol.* **72**, 3051-3059.

30. Joubert P, Pautigny C, Madelaine MF, Rasschaert D. (2000). Identification of a new cleavage site of the 3C-like protease of rabbit haemorrhagic disease virus. *J. Gen. Virol.* **81**, 481-8.
31. Alonso, J.M.M., Casais, R., Boga, J.A., and Parra, F.(1996). Processing of rabbit hemorrhagic disease virus polyprotein. *J. Virol.* **70**, 1261-1265.
32. Porter, A.G. (1993). Picornavirus nonstructural proteins: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell functions. *J. Virol.* **67**, 6917-6921.
33. Meyers. G., Wirblich, C., and Thiel, H.-J. (1991). Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protien-linked and packaged into particles. *Virology* **184**, 677-689.
34. Carter, M.J., Milton, I.D., Meanger, J., Bennett, M., Gaskell, R.M., and Turner, P.C. (1992). The complete nucleotide sequence of a feline calicivirus. *Virology* **190**, 443-448.
35. Matsuura Y, Tohya Y, Onuma M, Roerink F, Mochizuki M, Sugimura T. (2000) Expression and processing of the canine calicivirus capsid precursor. *J. Gen. Virol.* **81**,195-199.
36. Carter MJ, Milton ID, Turner PC, Meanger J, Bennett M, Gaskell RM. (1992) Identification and sequence determination of the capsid protein gene of feline calicivirus. *Arch. Virol.* **122**,223-235.
37. Wirblich C.(1995). Die Genomorganisation des Rabbbti Hemorrhagic Disease Virus (RHDV). PHD Thesis. LILIOM Verlag, München.
38. Paul AV, van Boom JH, Filippov D, Wimmer E. (1998). Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature* **393**,280-284.
39. Sosnovtsev, S., and Green, K.Y. (1995). RNA transcripts derived from a cloned full-length copy of the feline calicivirus genome do not require VPg for infectivity. *Virology* **210**, 383-390.
40. Meyers, G. (2003). Translation of the minor capsid protein of a claicivirus is initiated by a novel termination-dependent reinitiation mechanism. *J. Biol. Chem.* **278**, 34051-34060.
41. Thumfart, J.O., and G. Meyers (2002). Feline calicivirus: Recovery of wild-type and recombinant viruses after transfection of cRNA or cDNA constructs. *J. Virol.* **76**, 6398-6407.
42. Stanislav V. Sosnovtsev, Mark Garfield, and Kim Y. Green. 2002. Processing Map and Essential Cleavage Sites of the Nonstructural Polyprotein Encoded by ORF1 of the Feline Calicivirus Genome *J. Virol.* **76**, 7060-7072.