

# Postęp w badaniach nad organizacją genomu i funkcją glikoprotein herpeswirusa bydła typ 1 (BHV1, IBR/IPV)

Jerzy Rola  
Jan Żmudziński  
Zakład Wirusologii  
Państwowy Instytut Weterynaryjny  
Puławy

## 1. Wprowadzenie

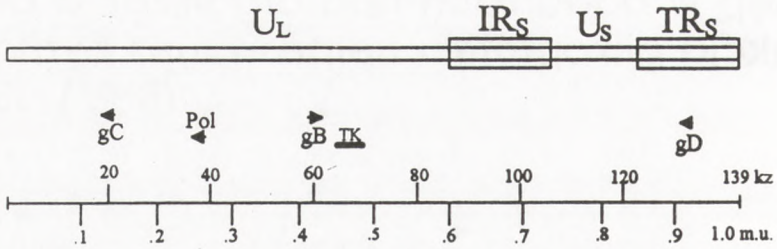
**H**erpeswirus bydłocy typ 1 (BHV 1), zwany potocznie wirusem IBR/IPV, należy do rodziny *Herpesviridae*, podrodziny *Alphaherpesvirinae* (16,33,34). Wirus ten jest szeroko rozpowszechniony w populacjach bydła i powoduje poważne straty ekonomiczne w hodowli zwierząt tego gatunku na całym świecie. Związane jest to z różnorodnością form klinicznych obserwowanych w przebiegu zakażenia wirusem BHV 1, do których należą: zakaźne zapalenie nosa i tchawicy, otręt, zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego, zapalenie spojówek, zapalenie wymienia, zakażenia przewodu pokarmowego, poronienia (17).

W Polsce spośród wymienionych form klinicznych zakażenia wirusem BHV 1 potwierdzono występowanie zakaźnego zapalenia nosa i tchawicy, otrętu, zapalenia spojówek i poronień (8,9,21,25).

Ze względu na duże znaczenie poznawcze i ekonomiczne problemu zakażeń wirusem BHV 1 przedstawiamy przegląd badań dotyczących organizacji genomu tegoż wirusa i funkcji głównych jego białek.

## 2. Budowa genomu oraz lokalizacja genów głównych białek wirusa

Cząstki herpeswirusów składają się z rdzenia zawierającego liniowy dwuniciowy DNA i kapsydu o symetrii ikozaedralnej otoczonego przez tegument i otoczkę. Na podstawie różnic w organizacji genomu wszystkie poznane dotychczas herpeswirusy ludzi i zwierząt podzielono na 6 grup oznaczonych literami od A do F. Genom wirusa BHV 1 ma długość około 140 kbp i należy do grupy D (rys. 1) (7,16,34).



Rys. 2. Organizacja genomu wirusa BHV1 i lokalizacja niektórych genów.

Lokalizacja genów: **Pol** — polimeraza; **TK** — kinaza tymidynowa; **gB**, **gC**, **gD** — glikoproteiny; **U<sub>L</sub>** — unique long region; **U<sub>S</sub>** — unique short region; **IR<sub>S</sub>** — inverted repeat; **TR<sub>S</sub>** — terminal repeat; **k.p.z.** — liczba par zasad w tysiącach; **m.u.** — map unit — jednostka mapowa umożliwiająca określenie pozycji genu.

się od formy prekursorowej o masie około 105 kDa. Po glikozylacji powstaje z niej dojrzała glikoproteina gB o masie 130 kDa. W badaniach przeprowadzonych za pomocą przeciwciał monoklonalnych wykazano, że dojrzała cząsteczka glikoproteiny gB jest heterodimerem zbudowanym z podjednostek o masie 55 i 74 kDa połączonych wiązaniami dwusiarczkowymi.

Glikoproteina gC określana również jako gIII, a w pracy Misry i wsp. jako GVP 3/9, jest homodimerem o masie cząsteczkowej 180 kDa zbudowanym z dwóch podjednostek o masie 91 kDa każda. Glikoproteina ta jest odpowiednikiem glikoprotein gC wirusa HSV 1 i gIII wirusa choroby Aujeszky'ego. Składa się z 521 aminokwasów. Gen kodujący glikoproteinę gC leży w odcinku długim L genomu BHV 1 (pozycja mapowa 0,122 do 0,135) (rys. 2). Gen ten charakteryzuje się wysoką zawartością zasad G+C (73%) i jest bardzo podobny pod tym względem do genu glikoproteiny gIII wirusa choroby Aujeszky'ego (75%) (15,32).

Glikoproteina gD jest również dimerem o masie cząsteczkowej 140 kDa zbudowanym z dwóch identycznych podjednostek wielkości 71kDa. Glikoproteina ta określana jest również jako gIV, a w pracy Misry i wsp. jako GVP 11b, składa się z 417 aminokwasów (37). Jest ona odpowiednikiem glikoprotein gD wirusa HSV 1 i gp 50 wirusa choroby Aujeszky'ego. Gen kodujący glikoproteinę gD położony jest w odcinku krótkim S genomu BHV 1 (pozycja mapowa od 0,892 do 0,902) (rys. 2). Zawartość zasad G+C jest również wysoka i wynosi 70%. Dla porównania zawartość zasad G+C genu glikoproteiny gp 50 wirusa choroby Aujeszky'ego wynosi 75%, a genu glikoproteiny gD wirusa HSV 1 65%.

Geny glikoprotein gE, gG i gI położone są w odcinku krótkim S genomu BHV 1. Białka te są odpowiednikami glikoprotein gE, gG i gI wirusa HSV 1 oraz gI, gX i gp 63 wirusa choroby Aujeszky'ego. Glikoproteina gE jest największym białkiem z tej grupy i składa się z 575 aminokwasów, zaś jej masa cząsteczkowa wynosi 61 kDa. Z kolei glikoproteina gI ma masę czą-

steżkową 39,9 kDa i składa się z 380 aminokwasów. Obie glikoproteiny tworzą wspólny kompleks co wykazano stosując metody immunoprecypitacji (2,19,23).

Gen glikoproteiny gH leży w odcinku długim L genomu BHV 1 bezpośrednio za genem kinazy tymidynowej (rys. 2). Gen ten wykazuje odpowiednio 26 i 32% homologię z genem gH wirusów HSV 1 i choroby Aujeszky'ego. Glikoproteina kodowana przez ten gen składa się z 842 aminokwasów (3,27).

Poza omówionymi glikoproteinami poznano także dokładną lokalizację sekwencji kodujących kinazę tymidynową (TK). Gen ten leży w odcinku długim L genomu BHV 1 (pozycja mapowa od 0,47 do 0,48). Enzym ten nie jest niezbędny do replikacji wirusa (4,5). Jednakże w przeprowadzonych badaniach mutantów TK<sup>-</sup> HSV 1 wykazano, że namnażały się one w hodowli komórek gorzej niż wirus TK<sup>+</sup> i charakteryzowały się zmniejszoną neuropatogেনnością (14,29).

### 3. Funkcje poszczególnych glikoprotein

Wymienione glikoproteiny biorą udział w procesie zakażenia komórki oraz w szerzeniu się zakażenia wirusowego w organizmie zwierzęcia. U alphaherpeswirusów proces wejścia wirusa do komórki przebiega w dwóch etapach. W trakcie pierwszego, obejmującego adsorbencję wirusa, dochodzi do oddziaływania białek wirusowych z receptorami powierzchni komórki. W etapie drugim następuje fuzja i wirus przenika do komórki. Glikoproteiny gB i gC uczestniczą w fazie adsorbencji wirusa na komórkach. Z kolei obecność glikoprotein gD, gH i gB wymagana jest do wejścia wirusa do komórki. Jednakże zjawisko to jeszcze nie jest w pełni poznane. W procesie rozprzestrzeniania się zakażenia z komórki do komórki istotną rolę odgrywają glikoproteiny gD, gE i gI (24,31,36).

Omawiane glikoproteiny są głównymi komponentami immunogennymi wirusa stymulującymi układ immunologiczny gospodarza. Dowiodły tego liczne badania prowadzone z użyciem przeciwciał monoklonalnych. Collins i wsp. (13) wykorzystując otrzymane przeciwciała monoklonalne wykazali istnienie czterech grup glikoprotein indukujących przeciwciała neutralizujące wirus BHV 1. Były to glikoproteiny o masach cząsteczkowych 82 kDa, 55-102 kDa, 115 kDa i 91 kDa. Chang i wsp. (10) wykazali, że za stymulację przeciwciał neutralizujących odpowiedzialne są glikoproteiny gp 135, gp 78 i gp54, określane przez innych autorów jako glikoproteina gB (p.w.).

Van Drunen Littel-van den Hurk i wsp. (44) określili liczbę oraz aktywność biologiczną epitopów glikoprotein gB i gC. Spośród 7 stwierdzonych epitopów glikoproteiny gB, 3 epitopy brały udział tylko w procesach neutralizacji wirusa, a 3 dalsze zarówno w neutralizacji jak i w lizie zakażonych komórek zależnej od przeciwciał. W przypadku jednego epitopu nie stwierdzono jakiegokolwiek aktywności. Natomiast na glikoproteinie gC badacze zlokalizowali 9 epitopów, z których 5 uczestniczyło tylko w lizie komórek zakażonych zależnej od przeciwciała, a jeden epitop brał udział w lizie i neutrali-

zacji. Trzy pozostałe epitopy były nieaktywne. Hughes i wsp. (18) w podobnych badaniach zidentyfikowali 3 domeny antygenowe na glikoproteinie gD, które brały udział w neutralizacji wirusa. Rozszerzając te badania Marshall i wsp. (26) przebadali zestaw 41 przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko głównym glikoproteinom wirusa BHV 1. Najliczniejszą grupę stanowiły przeciwciała reagujące z glikoproteiną gD. Dziewięć przeciwciał neutralizowało wirus całkowicie, dwa częściowo przy braku dopełniacza, a jeszcze dwa inne częściowo w jego obecności. Przeciwciała dla pozostałych glikoprotein cechowały się dużo mniejszą zdolnością neutralizacji wirusa i przeważnie wymagały do tego obecności dopełniacza.

#### 4. Wykorzystanie glikoprotein BHV 1 jako antygenu w szczepionkach podjednostkowych

Korzystając z przedstawionych wyników badań podjęto próby uodpornienia bydła glikoproteinami oczyszczonymi elektroforetycznie, chromatograficznie oraz uzyskanymi w różnych rekombinacyjnych układach ekspresji genów. Babiuk i wsp. (1,38,39,40) używali do prowadzonych przez siebie badań glikoprotein gB, gC i gD. Wykazali oni, że surowice immunizowanych zwierząt zawierały najwyższe miano przeciwciał neutralizujących w stosunku do glikoproteiny gD. Wykazali także, że przeciwciała dla tej glikoproteiny odpowiadają za wyraźne zmniejszenie się replikacji i siewstwa wirusa BHV 1 u zwierząt zakażonych doświadczalnie. Tikoo i wsp. (37) oraz Chase i wsp. (11,12) wprowadzając gen kodujący glikoproteinę gD do komórek fibroblastów bydłecy uzyskali komórki transgeniczne produkujące wymienioną glikoproteinę. Komórki te cechuje wysoka oporność na zakażenie wirusami BHV 1, HSV 1 i wirusem choroby Aujeszky'ego. Z kolei van Drunen Littel - van den Hurk i wsp. (41,42,43) uzyskali ekspresję genu kodującego glikoproteinę gD, wprowadzonego do genomu bakulowirusa wyizolowanego z ćmy *Autographa californica*, w komórkach linii owadziej SF 9. Produkowana glikoproteina była biologicznie aktywna i reagowała z przeciwciałami monoklonalnymi dla gD. Immunizacja bydła uzyskaną w ten sposób glikoproteiną powodowała indukcję wysokiego poziomu przeciwciał neutralizujących. Uzyskana odporność całkowicie zabezpieczała zwierzęta przed eksperymentalnym zakażeniem wirusem BHV 1, o czym świadczył brak gorączki, brak objawów klinicznych typowych dla IBR i brak siewstwa wirusa w wydzielinie z nosa.

Kolejnym krokiem było uzyskanie szczepionki delecyjnej przeciwko wirusowi BHV 1. Van Engelenburg i wsp. (45) usuwając region kodujący glikoproteinę gE z genomu wirusa BHV 1 skonstruowali mutantą delecyjnego BHV 1 gE<sup>-</sup>. Ponadto uzyskali również mutantą delecyjnego pozbawionego genu kinazy tymidynowej TK<sup>-</sup> i mutantą pozbawionego obu tych genów jednocześnie gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup>. Opracowanie właściwego testu immunoenzymatycznego, w którym do opłaszczania płytki wykorzystano glikoproteinę gE, umożliwiło

odróżnienie zwierząt uodpornianych szczepionką delecyjną  $gE^-$  od zwierząt zakażonych szczepami terenowymi wirusa BHV 1 ( $gE^+$ ). Wyselekcjonowanymi mutantami immunizowano bydło badając ich zjadliwość i immunogenność. Stwierdzono, że mutant  $TK^-$  posiadał resztkową zjadliwość, podczas gdy mutanty  $gE^-$  i  $gE^-/TK^-$  były całkowicie niezjadliwe. Jednocześnie mutant  $gE^-$  zabezpieczał immunizowane cielęta przed zachorowaniem po zakażeniu kontrolnym. Jednakże stwierdzono, że immunizacja mutantem  $gE^-$  nie zabezpieczała przed siewstwem wirusa, który został użyty do zakażenia kontrolnego, choć ilość wirusa wydalanego przez zwierzęta immunizowane uległa znacznemu zmniejszeniu w porównaniu do ilości wirusa wydalanego przez zwierzęta nie immunizowane. Kit i wsp. (20) przeprowadzili podobne próby immunizacji bydła używając mutantu  $TK^-$  BHV1. Zaszczepione zwierzęta rozwijały wysokie miana przeciwciał neutralizujących i nie wykazywały objawów klinicznych charakterystycznych dla IBR. Szczepienie zabezpieczało także przed zachorowaniem po donosowym zakażeniu kontrolnym szczepami Los Angeles i Cooper wirusa BHV 1. Nie obserwowano rewersji wirusa  $TK^-$  do formy dzięki  $TK^+$ . Jednakże autorzy ci stwierdzili, że szczepienie mutantem  $TK^-$  BHV 1 nie zabezpieczało zwierząt przed zakażeniem latentnym jakie powodował szczep użyty do zakażenia kontrolnego. Ponadto Whetstone i wsp. (46) izolując po podaniu deksametazonu wirus  $TK^-$  BHV 1 od wszystkich zwierząt, którym podano go donosowo i dopochwowo wykazali, że sam mutant  $TK^-$  BHV 1 posiada zdolność wywoływania zakażenia latentnego. Poczynione obserwacje podważają zamiar wykorzystywania mutantów delecyjnych BHV 1 do produkcji szczepionek i stosowania równoważnych testów serologicznych dla odróżnienia zwierząt uodpornionych (niezakażonych) od zwierząt zakażonych, u których okresowo następuje siewstwo wirusa. Stosowanie takich szczepionek nie doprowadza zatem do uzdrowienia stada od zakażenia wirusem BHV 1.

## 5. Podsumowanie

W badaniach nad organizacją genomu oraz funkcją i znaczeniem biologicznym głównych białek wirusa BHV 1 odnotować można duże osiągnięcia. Jednakże mimo dość dokładnego poznania organizacji genomu oraz funkcji najważniejszych elementów składowych wirusa wiele zagadnień wymaga dalszych badań. Dotyczy to szczególnie zjawiska latencji wirusa BHV 1, co bezpośrednio wiąże się z zagadnieniami profilaktyki i zwalczania zakażeń BHV 1 u bydła.

## Literatura

1. Babiuk L. A., L'italien J., van Drunen Littel-van den Hurk S., Zamb T., Lawman M. J. P., Hughes G., Gifford G. A., (1987), *Virology*, 159, 57-66.
2. Baranowski E., Dubuisson J., Pastoret P. P., Thiry E., (1993), *Arch. Virol.*, 133, 97-111.

3. Baranowski E., Dubuisson J., van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk L. A., Michel A., Pastoret P. P., Thiry E., (1995), *Virology*, 206, 651-654.
4. Bello L. J., Whitbeck J. Ch., Lawrence W. C., (1987), *J. Virol.*, 61, 4023-4025.
5. Bello L. J., Whitbeck J. Ch., Lawrence W. C., (1992), *Virology*, 189, 407-414.
6. Bolton D. C., Zee Y. C., Ardans A. A., (1983), *Vet. Microbiol.*, 8, 57-68.
7. Borchers K., Goltz M., Ludwig H., (1994), *Acta Veterinaria Hungarica*, 42, 217-225.
8. Buczek J., Deptuła W., Deptuła D., (1981), *Medycyna Wet.*, 37, 426-429.
9. Buczek J., Rokosz B., Wrzolek-Lobočka G., (1981), *Medycyna Wet.*, 37, 169-171.
10. Chang L. W. S., Zee Y. C., Pritchett R. F., Ardans A. A., (1986), *Arch. Virol.*, 88, 203-215.
11. Chase Ch. C. L., Carter-Allen K., Letchworth G. J., (1989), *J. Gen. Virol.*, 70, 1561-1569.
12. Chase Ch. C. L., Carter-Allen K., Lohff C., Letchworth G. J., (1990), *J. Virol.*, 64, 4866-4872.
13. Collins J. K., Butcher A. C., Riegel C. A., McGrane V., Blair C. D., Teramoto Y. A., Winston S., (1984), *J. Virol.*, 52, 403-409.
14. Field H. J., Wildy P., (1978), *J. Hyg.*, 81, 267-277.
15. Fitzpatrick D. R., Babiuk L. A., Zamb T. J., (1989), *Virology*, 173, 46-57.
16. Foulon T., (1992), *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 15, 13-29.
17. Gibbs E. P. J., Rweyemamu M. M., (1977), *Vet. Bull.*, 47, 317-343.
18. Hughes G., Babiuk L. A., van Drunen Littel-van den Hurk S., (1988), *Arch. Virol.*, 103, 47-60.
19. Jacobs L., (1994), *Arch. Virol.*, 137, 209-228.
20. Kit S., Qavi H., Gaines J. D., Billingsley P., McConnell S., (1985), *Arch. Virol.*, 87, 63-83.
21. Kita J., (1978), *Medycyna Wet.*, 34, 723-725.
22. Lawrence W. C., D'Urso R. C., Kundel C. A., Whitebeck J. Ch., Bello L. J., (1986), *J. Virol.*, 60, 405-414.
23. Leung-Tack P., Audonnet J. C., Riviere M., (1994), *Virology*, 199, 409-421.
24. Liang X., Babiuk L. A., van Drunen Littel-van den Hurk S., Fitzpatrick D. R., Zamb T. J., (1991), *J. Virol.*, 65, 1124-1132.
25. Majewska H., Baczyński Z., Czaki M., (1977), *Bull. Vet. Inst. Puławy*, 21, 29-32.
26. Marshall R. L., Rodriguez L. L., Letchworth G. J., (1986), *J. Virol.*, 57, 745-753.
27. Meyer A. L., Petrovskis E. A., Duffus W. P. H., Thomsen D. R., Post L. E., (1991), *Biochimica et Biophysica Acta*, 1090, 267-269.
28. Misra V., Blumenthal R. M., Babiuk L. A., (1981), *J. Virol.*, 40, 367-378.
29. Mittal S. K., Field H. J., (1989), *J. Gen. Virol.*, 70, 901-918.
30. Pastoret P. P., Burtonboy G., Aguilar-Setien A., Godart M., Lamy M. E., Schoenaers F., (1980), *Vet. Microbiol.*, 5, 187-194.
31. Rijsewijk F., Kaashoek M., Keil G., Paal H., Ruuls R., van Engelenburg F., van Oirschot J., (1994), *Proceedings of the 19<sup>th</sup> International Herpesvirus Workshop, Vancouver, July 30-August 5 1994*, 419.
32. Robbins A. K., Watson R. J., Whealy M. E., Hays W. W., Enquist L. W., (1986), *J. Virol.*, 58, 339-347.
33. Roizman B., (1992), *Arch. Virol.*, 123, 425-449.
34. Roizman B., Baines J., (1991), *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 14, 63-79.
35. Sklyanskaya E. J., Itkin Z. B., Gofman Y. P., Kaverin N. V., (1977), *Acta Virol. Praga*, 21, 273-279.
36. Spear P.G., (1993a), *Seminars in Virol.*, 4, 167-180.
37. Tikoo S. K., Fitzpatrick D. R., Babiuk L. A., Zamb T. J., (1990), *J. Virol.*, 64, 5132-5142.
38. van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk L. A., (1985), *Virology*, 144, 204-215.
39. van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk L. A., (1986), *J. Virol.*, 59, 401-410.
40. van Drunen Littel-van den Hurk S., Gifford G. A., Babiuk L. A., (1990), *Vaccine*, 8, 358-368.

41. van Drunen Littel-van den Hurk S., Parker M. D., Fitzpatrick D. R., van den Hurk J. V., Campos M., Babiuk L. A., Zamb T., (1992), *Virology*, 190, 378-392.
42. van Drunen Littel-van den Hurk S., Parker M. D., Massie B., van den Hurk J. V., Harland R., Babiuk L. A., Zamb T. J., (1993), *Vaccine*, 11, 25-35.
43. van Drunen Littel-van den Hurk S., Parker M. D., Fitzpatrick D. R., Zamb T. J., van den Hurk J. V., Campos M., Harland R., Babiuk L. A., (1991), *J. Virol.*, 65, 263-271.
44. van Drunen Littel-van den Hurk S., van den Hurk J. V., Babiuk L. A., (1985), *Virology*, 144, 216-227.
45. van Engelenburg F. A. C., Kaashoek M. J., Rijsewijk F. A. M., van den Burg L., Moerman A., Gielkens A. L. J., van Oirschot J. T., (1994), *J. Gen. Virol.*, 75, 2311-2318.
46. Whetstone C. A., Miller J. M., Seal B. S., Bello L. J., Lawrence W. C., (1992), *Arch. Virol.*, 122, 207-214.
47. Whitbeck J. Ch., Bello L. J., Lawrence W. C., (1988), *J. Virol.*, 62, 3319-3327.

## Genome organization and function of BHV 1 proteins

### Summary

Bovine herpesvirus 1 (BHV 1) called also IBR/IPV virus is a member of the *Herpesviridae* family, *Alphaherpesvirinae* subfamily. The BHV 1 virus is an important pathogen of cattle, widely spread in the world. It is responsible for various diseases like infectious bovine rhinotracheitis (IBR), pustular vulvovaginitis (IPV), encephalitis, conjunctivitis, mastitis, enteritis and abortion. Four clinical forms of BHV 1 infections have been confirmed in Poland.

The paper summarises the research review on genome organization and function of the essential BHV 1 proteins. BHV 1 genome is composed of a unique long segment U<sub>L</sub> and a unique short segment U<sub>S</sub> flanked by inverted repeats IR<sub>S</sub> and TR<sub>S</sub>. The genome codes for 28-35 major envelope proteins among which gB, gC, and gD play an important role in virus attachment and penetration into cells. Glycoprotein gD plays a crucial role in the stimulation of immune response and antibodies against gD, neutralizing virus infectivity.

### Key words:

BHV1, IBR/IPV, glycoproteins, genome organization, vaccines, latency.

### Adres do korespondencji:

Jerzy Rola, ul. Kościuszki 19/16, 57, 24-100 Puławy.