

## Biologia molekularna wirusa kleszczowego zapalenia mózgu

### Molecular biology of the tick-borne encephalitis virus

Aleksandra Drelich, Piotr Kruszyński, Tomasz J. Wąsik

#### STRESZCZENIE

Katedra i Zakład Wirusologii  
Wydziału Farmaceutycznego  
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego  
w Katowicach

Wirus kleszczowego zapalenia mózgu (TBEV) jest czynnikiem sprawczym groźnego, sezonowego schorzenia ośrodkowego układu nerwowego przenoszonego przez kleszcze, zwanego kleszczowym zapaleniem mózgu (KZM). Należy on do rodziny *Flaviviridae*, do grupy wirusów atakujących komórki ssaków, gdzie zaliczany jest do rodzaju *Flavivirus*. Wyodrębnia się trzy podtypy wirusa: europejski, przenoszony przez *I. ricinus* oraz dalekowschodni i syberyjski, przenoszone przez *I. persulcatus*. Podtypy te wykazują bliskie pokrewieństwo pod względem filogenetycznym i antygenowym, jednakże przebieg zakażenia nimi wykazuje znaczne różnice w obrazie klinicznym. Dojrzały wirion TBEV ma kształt sferyczny z osłonką lipidową, w której zakotwiczone są dwa białka wirusowe E i M. Niedojrzała forma wirionu zawiera prekursorowe białko PrM pełniące rolę białka chaperonowego. Rdzeń wirusa stanowi nukleokapsyd utworzony przez białko C połączone z genomem wirusa. Genom, w postaci (+)ssRNA, koduje trzy białka strukturalne (C, PrM, E) i siedem niestrukturalnych (NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B, NS5). Oba końce genomowego RNA flankowane są przez regiony UTR, między nimi znajduje się pojedyncza ORF kodująca pojedynczą poliproteinę, z której poprzez proteolityczne cięcia powstają funkcjonalne białka wirusa. Interakcja TBEV z komórką zachodzi poprzez oddziaływanie glikoproteiny E wirusa z niepoznanymi, jak dotąd, receptorami. Po wejściu wirusa do komórki na drodze endocytozy, dochodzi do fuzji osłonki wirusa z błoną endosomalną i odpłaszczenia genomu wirusowego. Translacja, replikacja i składanie wirionów potomnych zachodzą w obrębie błon ER. Wirus uwalniany jest z komórki na drodze egzocytozy. Wydaje się, iż tempo ewolucji TBEV jest niskie, co wiąże się z biologią kleszczy.

#### ADRES

#### DO KORESPONDENCJI:

Dr hab. n. med. Tomasz J. Wąsik  
Katedra i Zakład Wirusologii  
Wydziału Farmaceutycznego  
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego  
w Katowicach  
ul. Jagiellońska 4  
41-200 Sosnowiec  
tel. 32 364 16 21  
e-mail: twasik@sum.edu.pl

#### SŁOWA KLUCZOWE

kleszczowe zapalenie mózgu, flawiwirus, KZM, kleszcze, *Ixodes ricinus*, podtyp, glikoproteina E, genom, zmienność genetyczna, analiza filogenetyczna

Ann. Acad. Med. Siles. 2011, 65, 3, 54–63  
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny  
w Katowicach  
ISSN 0208-5607

## ABSTRACT

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) is an etiological agent of dangerous, seasonal disorder of the central nervous system transmitted by ticks, known as tick-borne encephalitis (TBE). TBEV is a member of the *Flaviviridae* family, the mammalian group and is a species within the genus *Flavivirus*. There are three subtypes of TBEV: European transmitted by *I. ricinus*, Far Eastern and Siberian transmitted by *I. persulcatus*. All subtypes are closely related both genetically and antigenically. However course of infection with particular subtypes show significant clinical differences. Mature virions are spherical in shape with lipid bilayer envelope in which two surface proteins, E and M, are embedded. Immature form of virion contains a precursory protein PrM acting as a chaperone protein. The virus core constitutes an nucleocapsid composed of protein C combined with the genome of the virus. The genome, in the form of a single positive-stranded RNA, encodes for three structural proteins (C, PrM, E) and a set of seven non-structural proteins (NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B, NS5). Both ends of the genomic RNA are flanked by the UTR regions, between which there is a single ORF encoding a single polyprotein, from which functional viral proteins are formed through proteolytic cleavage. TBEV interaction with the cell occurs via interaction of the viral glycoprotein E with as yet unidentified receptors. After the entry of virus into the cell by endocytosis, fusion of the virus envelope with endosomal membrane occurs leading to the viral genome uncoating. Translation, replication and assembly of progeny virions occur within the ER membrane. The virus is released from cells by exocytosis. It appears that the rate of TBEV evolution is low, which is associated with the biology of ticks.

## KEY WORDS

tick-borne encephalitis, TBE, flavivirus, ticks, *Ixodes ricinus*, subtype, E glycoprotein, genome, genetic variability, phylogenetic analysis

## SYSTEMATYKA

Wirus kleszczowego zapalenia mózgu (*tick-borne encephalitis virus* – TBEV) jest przyczyną sezonowego schorzenia ośrodkowego układu nerwowego przenoszonego przez kleszcze, zwanego kleszczowym zapaleniem mózgu (KZM; *tick-borne encephalitis* – TBE). Wirus został odkryty w 1937 r. w trakcie wyprawy na dalekowschodnie obszary Rosji, przeprowadzonej pod kierownictwem Leva Zilberta w celu odnalezienia przyczyny ostrego zapalenia mózgu rozwijającego się po ukąszeniu przez kleszcza [1].

Wirus ten należy do rodzaju *Flavivirus*, stanowiącego wraz z rodzajami *Pestivirus* i *Hepacivirus* rodzinę *Flaviviridae*. Rodzina *Flaviviridae* zaliczana była niegdyś do rodziny *Togaviridae*, która wraz z *Bunyviridae*, *Arenaviridae* oraz *Reoviridae*, ze względu na specyficzną drogę transmisji, stanowiła wspólną grupę wirusów, zwaną „arbowirusami” – patogenami przenoszonymi przez stawonogi (*arthropod-borne viruses*). Wirusy z tej grupy cechują się ponadto zbliżoną epidemiologią i wywołują podobne objawy kliniczne [1,2].

Do rodzaju *Flavivirus* zalicza się około 70 gatunków wirusów sklasyfikowanych w trzech grupach w zależności od przenoszących je stawonogów, tj. wirusy przenoszone przez komary (*the mosquito-borne viruses*), wirusy przenoszone przez kleszcze (*the tick-borne viruses*) oraz wirusy o nieznanym drodze transmisji (*no known vector viruses* – KNV). Dodatkowo w obrębie wirusów przenoszonych przez kleszcze wyróżnia się wirusy ssaków (*mammalian viruses*) i ptaków morskich (*seabird viruses*) [3,4].

Wirus omawiany w niniejszej pracy należy do grupy wirusów atakujących komórki ssaków i razem z innymi jej przedstawicielami stanowi grupę wirusów blisko spokrewnionych genetycznie i antygenowo. Wraz z należącymi do tej grupy wirusem choroby skokowej owiec LIV (*Louping ill virus*) oraz POWV (*Powassan virus*) uważany jest za czynnik etiologiczny ludzkiej encefalopatii [5,6]. TBEV stanowi pojedynczy gatunek, jednakże liczne badania nad jego izolatami z różnych obszarów geograficznych umożliwiły wyodrębnienie początko-

wo dwóch podtypów: europejskiego, znanego poprzednio jako środkowoeuropejski (TBEV-Eu, CEE – *Central European encephalitis virus*) i dalekowschodniego, wcześniej zwanego rosyjskim wiosenno-letnim (TBEV-FE, RSEE – *Russian spring-summer encephalitis virus*) [7]. Potwierdzeniem zróżnicowania szczepów w obrębie obu podtypów TBEV była głównie analiza oparta na badaniach serologicznych szczepów wyizolowanych na obszarze Europy i pochodzących z Dalekiego Wschodu oraz analiza porównawcza uzyskanych sekwencji genowych z sekwencjami genomów szczepów prototypowych obecnych na omawianych obszarach (*Neudoerfl* dla TBEV-Eu i *Soffin* dla TBEV-FE) [3]. Dokładna analiza porównawcza sekwencji genu kodującego białko E wykazała istnienie trzeciej linii genetycznej wirusa, blisko związanej z podtypem dalekowschodnim – podtypu syberyjskiego (TBEV-Sib, *West Siberian virus*) [2,8].

**Systematyka według International Committee on Taxonomy of Viruses Database (ICTVDB) <http://www.ictvdb.org>**

Rodzina: Flaviviridae

Rodzaj: *Flavivirus*

Grupa:

**Wirusy przenoszone przez kleszcze (*tick-borne viruses*)**

– **Mammalian tick-borne virus**

*Alkhurma hemorrhagic fever virus* (AHFV)

*Gadgets Gully virus* (GGYV)

*Karshi virus* (KSIV)

*Kyasanur Forest disease virus* (KFDV)

*Langat virus* (LGTV)

*Louping ill virus* (LIV)

*Omsk hemorrhagic fever virus* (OHFV)

*Powassan virus* (POWV)

*Royal Farm virus* (RFV)

*Tick-borne encephalitis virus* (TBEV)

Podtypy:

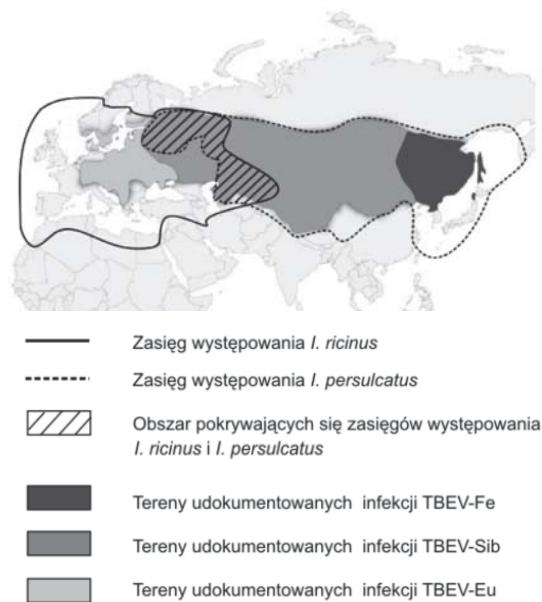
europejski (TBEV-Eu – *Central European encephalitis virus*, CEE)

dalekowschodni (TBEV-Fe – *Russian spring-summer encephalitis virus*, RSSE)

syberyjski (TBEV-Sib – *West Siberian*)

Kleszcze, stanowiące zarówno wektor, jak i rezerwuar wirusa, rozprzestrzenione są na dużym obszarze Eurazji, tworząc podpopulacje, co doprowadziło w toku ewolucji molekularnej do powstania podtypów wirusa. *Ixodes ricinus* przenosi głównie podtyp europejski, rozpowszechniony na obszarze od Uralu aż po

region Alzacji w północno-wschodniej Francji oraz od Skandynawii do północnego wybrzeża Adriatyku. Dwa pozostałe podtypy, związane z *Ixodes persulcatus*, występują przede wszystkim na Syberii, w Finlandii oraz w krajach nadbałtyckich, wyizolowano je również na terenach środkowej i wschodniej Azji, w tym w Chinach i Japonii [4,7,9] (ryc. 1). Na niektórych obszarach Syberii i Dalekiego Wschodu, gdzie *I. persulcatus* nie jest gatunkiem dominującym, stwierdzono obecność wirusa w innych gatunkach kleszczy twardych (*Ixodidae*), tj. *Dermacentor reticulatus*, *D. silvarum*, *Haemaphysalis concinna*, a w Chinach TBEV został wyizolowany z *I. ovatus* [4]. Sporadycznie TBEV był izolowany z co najmniej 15 innych gatunków kleszczy, jak również z wielu innych pasożytów (tj. muchy, pchły, wszy, komary), jednak uważa się, iż nie ma to większego znaczenia w kontekście transmisji wirusa na człowieka [10]. Wszystkie podtypy wirusa wykazują bliskie pokrewieństwo pod wzglę-



**Ryc. 1.** Zasięg występowania gatunków kleszczy, będących wektorami TBEV oraz obszary, na których stwierdzono przypadki zakażeń poszczególnymi podtypami TBEV. *I. ricinus* występuje głównie w Europie, z kolei *I. persulcatus* – w Azji. Obszary, na których żyją oba gatunki kleszczy, w dużej mierze pokrywają się z terenami, na których stwierdza się przenoszone przez nie podtypy TBEV [1,9].

**Fig. 1.** The range of the occurrence of tick species being TBEV vectors and areas of individual TBE virus subtypes' infections. *I. ricinus* is present mainly in Europe whereas *I. persulcatus* is found in Asia. The areas of occurrence of both tick species overlap to a large extent with fields where the TBEV subtypes transmitted by these species are found [1,9].

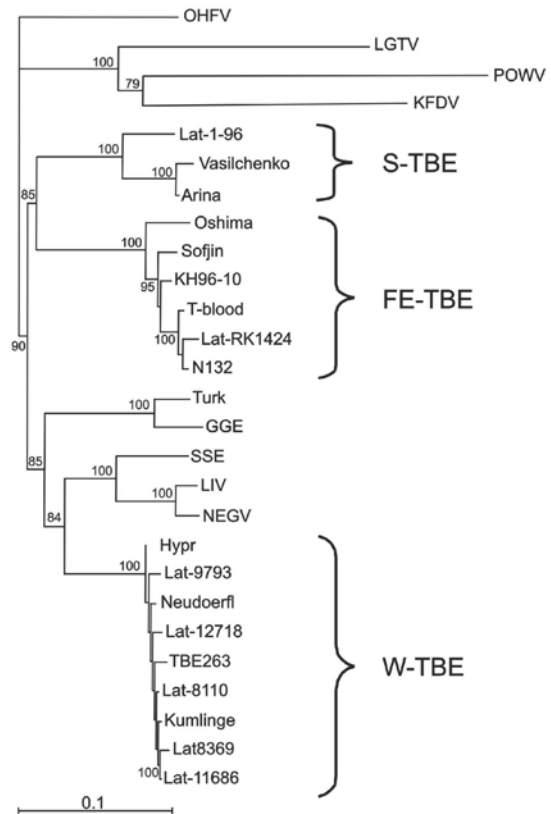
dem filogenetycznym i antygenowym [6]. Według Eckera i wsp. (1999), zróżnicowanie w sekwencji aminokwasów wynosi około 2% w obrębie podtypu oraz 5–6% między poszczególnymi podtypami [1]. Badania na myszach poddanych immunizacji (Holzmann i wsp., 1992) ukazały wysoki stopień odporności krzyżowej między podtypami europejskim i dalekowschodnim [4].

Pomimo niewielkich różnic w I-rzędowej strukturze białek wirusowych, przebieg zakażenia poszczególnymi podtypami wykazuje znaczne różnice w obrazie klinicznym. W przypadku podtypu dalekowschodniego zakażenie ma zwykle postać ostrą, często z objawami neurologicznymi, w 5–35% przypadków kończąc się śmiercią. Zakażenie podtypem syberyjskim charakteryzuje łagodniejszy przebieg, z tendencją do rozwoju zakażenia przewlekłego, ze śmiertelnością rzędu 1–3%. W przypadku podtypu europejskiego zakażenie ma charakter głównie bezobjawowy, natomiast postać objawowa w około 72% przypadków przebiega dwufazowo, prowadząc do zgonu 1–2% chorych [11,12].

**FIOLOGENEZA**

Dotychczasowe badania nad filogenezą oraz epidemiologią molekularną TBEV wskazują, że flawiirusy przenoszone przez kleszcze (*the tick-borne viruses*) stanowią grupę wirusów wyraźnie różniących się od wirusów przenoszonych przez komary (*the mosquito-borne viruses*), wydaje się też, iż ich tempo ewolucji jest niższe [1]. Przyczyny tego zjawiska doszukuje się w biologii kleszczy stanowiących główny wektor i rezerwuuar wirusa. Stosunkowo długi czas życia kleszczy (3–7 lat) oraz mała częstość pobierania pokarmu (3 razy w ciągu życia) prowadzą do znacznego ograniczenia tempa replikacji wirusa w kleszczach oraz umożliwiają przetrwanie poszczególnym liniom wirusowym przez długi czas [13]. Co więcej, jak dotąd brak dowodów na występowanie rekombinacji genetycznych w obrębie tej grupy flawiirusów [1]. Badania nad filogenezą TBEV ogniskują się głównie na analizie porównawczej sekwencji kodujących główną glikoproteinę osłonkową wirusa (Gp E) oraz dwa białka niestrukturalne – NS3 oraz NS5 istotne w trakcie replikacji. Badania prowadzone w ciągu ostatnich lat zaowocowały stworzeniem wielu drzew filogenetycznych przedstawiających podobne zależności pomiędzy sekwencjami licznych izolatów TBEV [3].

Jak już wspomniano, w obrębie gatunku TBEV wyróżnia się trzy podtypy wirusa – TBEV-Eu, przenoszony głównie przez *I. ricinus*, oraz TBEV-FE i TBEV-Sib, związane z *I. persulcatus*, a wszystkie podtypy wykazują duże podobieństwo pod względem genetycznym i antygenowym. Ostatnie badania wskazują, że podtypy TBEV-FE i TBEV-Sib są filogenetycznie bliżej spokrewnione w porównaniu z podtypem europejskim, TBEV-Eu natomiast wydaje się wykazywać większe podobieństwo do wirusa LIV [3] (ryc. 2). Opierając się na najnowszych danych rozważa się wprowadzenie alternatywnego podziału taksonomicznego TBEV wyodrębniającego cztery podtypy wirusa – podtyp zachodni (TBEV-Eu); podtyp wschodni obejmujący TBEV-FE i TBEV-Sib; podtyp LIV występujący w Hiszpanii, Wielkiej Brytanii i Irlandii oraz podtyp TSEV (*Turkish sheep encephalitis virus*), obejmujący GGEV (*Greek*



**Ryc. 2.** Drzewo filogenetyczne, otrzymane w wyniku porównania sekwencji genu kodującego glikoproteinę E metodą *neighbour-joining*. Widoczne są izolaty należące do poszczególnych podtypów TBEV oraz flawiirusy blisko z nim spokrewnione [3].

**Fig. 2.** Phylogenetic tree obtained by the comparison of the glycoprotein E gene sequences using the neighbour-joining method. The isolates belonging to individual TBEV subtypes as well as flaviviruses closely related to them are noticeable [3].

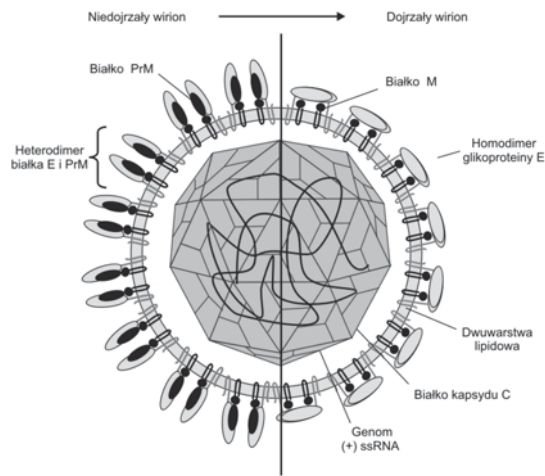
*goat encephalitis virus*). Dodatkowo w obrębie TBEV-Sib wyodrębnia się dwie linie filogenetyczne – bałtycką (obecną w obrębie krajów bałtyckich, Finlandii i części europejskiej Rosji) oraz syberyjską (obecną w krajach Dalekiego Wschodu i na Syberii) [14].

Analiza antygenowa z użyciem przeciwciał monoklonalnych oraz badania porównawcze sekwencji licznych izolatów wirusa zaowocowały obserwacjami, iż różnorodność w obrębie szczepów TBEV przenoszonych przez *I. persulcatus* jest znacznie większa niż w przypadku szczepów związanych z *I. ricinus* i rozwijała się tysiące lat. Szczepy w obrębie TBEV-Eu cechuje bardzo duże podobieństwo genetyczne, nie wykazują one tendencji do tworzenia przejrzystych grup genetycznych na konkretnych obszarach geograficznych Europy ani nie ulegają istotnym wariacjom antygenowym pod wpływem czynników środowiskowych, a w przeszłości najprawdopodobniej rozprzestrzeniły się wraz z wędrującym ptactwem [1,6]. Rozważa się także, iż różnice we właściwościach patogennych poszczególnych podtypów TBEV i innych wirusów przenoszonych przez kleszcze (LIV, POWV, LGTV) mogą być wynikiem ewolucji przystosowawczej wirusów do różnych gatunków kleszczy [10].

#### BUDOWA WIRIONU

Dojrzały wirion TBEV ma kształt kulisty o średnicy 40–60 nm. Pokryty jest dwuwarstwą lipidową, w której zakotwiczone są dwa wirusowe białka błonowe – E (*envelope*) oraz M (*membrane*) [5]. Niedojrzała forma wirionu zawiera prekursorowe białko PrM (*precursor of M*) (ryc. 3), z którego fragment Pr ulega odłączeniu przez komórkową proteazę furynową w sieci *trans* aparatu Golgiego, umożliwiając sekrecję dojrzałego wirionu poza zakażoną komórkę [15]. Glikoproteina E, o masie cząsteczkowej 53–60 kDa, zbudowana średnio z 495 aminokwasów (aa), w przeciwieństwie do białek powierzchniowych wielu innych wirusów posiadających lipidową osłonkę, nie wykształca struktur  $\alpha$ -helikalnych, a jej cząsteczki zwrócone są równolegle do powierzchni osłonki wirionu, przyjmując głównie konformację  $\beta$ . Opierając się na technice krystalografii rentgenowskiej określono, iż białko E ma postać trwałych dimerów tworzących strukturę przypominającą sieć o gęstym utkaniu [16]. Każdy z monomerów występuje w konfiguracji „głowa-ogon” (*head-to-tail*), tworząc na

powierzchni wirionu unikatowy wzór, tzw. wzór w jodełkę (*herringbone*).



**Ryc. 3.** Struktura wirionu TBEV.

Wirion TBEV, o kształcie kulistym i średnicy około 50 nm, pokrywa dwuwarstwowa osłonka lipidowa. W osłonce niedojrzałego wirionu zakotwiczone są heterodimery białek PrM (*pre-M*) i E (*envelope*) (po lewej). W trakcie dojrzewania wirionu, z białka PrM odcinany jest fragment Pr, w wyniku czego w osłonce formują się oddzielne homodimery białka E i M (*membrane*) (po prawej). Rdzeń wirusa stanowi ikosaedralny kapsyd o średnicy około 30 nm utworzony przez nieglikozylowane białko C (*capsid*), połączone z genomem wirusowym [(+)ss RNA].

**Fig. 3.** The structure of the TBEV virion.

The TBEV virion of spherical shape and the diameter of 50 nm is surrounded by lipid envelope. The PrM (*pre-M*) and E (*envelope*) proteins heterodimers are anchored in the lipid bilayer (on left). The Pr fragment is cut off from the PrM protein during maturation of the virion resulting in the separate E and M (*membrane*) protein homodimers formation (on right). The virion core comprises icosahedral capsid of the diameter of 30 nm composed of non-glycosylated C (*capsid*) protein connected with the [(+)ss RNA] viral genome.

Część zewnętrzna każdego z monomerów składa się z trzech wyraźnych domen strukturalnych (I–III). Centralna N-końcowa domena I utworzona jest z 8  $\beta$ -struktur i zawiera dwa mostki dwusiarczkowe. Sąsiaduje ona z C-końcową podłużną domeną II, która poza dwoma krótkimi  $\alpha$ -helisami składa się głównie z  $\beta$ -struktur. Domena II zawiera peptyd fuzyjny pośredniczący w fuzji błon. Po drugiej stronie domeny centralnej występuje immunoglobulinopodobna domena III połączona z domeną I poprzez krótki odcinek złożony z 15 aa. Domena ta ma postać struktury  $\beta$ -baryłki ( *$\beta$ -barrel*) składającej się z 7 antyrównoległych struktur  $\beta$  i zawiera pojedynczy mostek dwusiarczkowy. W jej obrębie obecne jest

prawdopodobnie miejsce wiązania receptora [1]. Przypuszcza się, iż niektóre reszty aminokwasowe umiejscowione w bocznej przestrzeni domeny III, zwłaszcza reszta Asp 308, mogą stanowić istotną determinantę neuroinfekcyjności wirusa i odgrywać rolę w początkowym etapie zakażenia, podczas swoistego wiązania z nieznanym do tej pory receptorem komórkowym [8, 17]. Ponadto okazało się, iż domena III stanowi istotny cel swoistych przeciwciał neutralizujących wytwarzanych przez zakażony organizm [8].

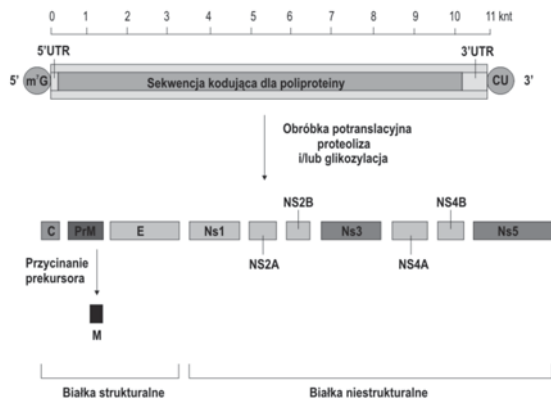
Białko M (*membrane*), o masie 7,5–8 kDa, składające się z około 75 aa, powstaje w wyniku proteolizy końca karboksylowego prekursorowej proteiny PrM (około 168 aa), tworząc wraz z białkiem E struktury powierzchniowe o długości 6 nm. Proteina ta razem z białkiem E bierze udział w wiązaniu wirusa z komórką. Niedojrzała, niezakaźna forma wirionu zawiera proteiny PrM i E tworzące heterodimeryczny kompleks PrM-E na powierzchni wirionu [6]. PrM uczestniczy w prawidłowym składaniu białka osłonki. Pełni rolę białka chaperonowego, ochraniając proteinę E przed przedwczesną fuzją błon podczas transportu poprzez szlaki wydzielnicze [15,18]. Dojrzała postać wirionu składa się z białka M powstałego poprzez proteolityczne cięcie w obrębie PrM w trakcie procesu dojrzewania wirionu. Cięcie to prowadzi do dysocjacji heterodimerów z uwolnieniem fragmentu Pr i jednoczesnej reorganizacji białka E. W rezultacie dochodzi do nieodwracalnych zmian w konformacji białka E przyjmującego formę homodimerów [6,18,19,20]. Kolejna reorganizacja w obrębie białka E zachodzi w świetle pęcherzyków endosomalnych, w których w warunkach obniżonego pH dochodzi do rearanzacji dimerów białka E w formy trimeryczne. Prowadzi to do odsłonięcia peptydu fuzyjnego i jego wyeksponowania w kierunku błony endosomalnej, co z kolei indukuje fuzję obu błon i uwolnienie wirusowego genomu do cytoplazmy [1,8].

Rdzeń wirusa, o dużej gęstości elektronowej, stanowi ikosaedralny nukleokapsyd o średnicy około 30 nm, utworzony przez nieglikozyłowane białko C (*capsid*) (112 aa) o masie 11 kDa, połączone z genomem wirusowym. Połączenie białka C z kwasem nukleinowym jest możliwe dzięki obecności silnie zasadowych reszt aminokwasowych na C i N-końcu białka C. Podstawowym składnikiem budulcowym nukleokapsydu jest dimer białka C. Analiza spektroskopowa NMR (*nuclear magnetic*

*resonance*) [21] i krystalografia rentgenowska [22] wykazały, iż każdy z monomerów białka C zorganizowany jest w cztery wyraźne  $\alpha$ -helisy (od  $\alpha$ -1 do  $\alpha$ -4). Środkową część białka stanowi konserwatywna domena hydrofobowa, obejmująca dwie  $\alpha$ -helisy ( $\alpha$ 2 i  $\alpha$ 3) pośredniczące w oddziaływaniu nukleokapsydu z otaczającą błoną fosfolipidową, pełniąc zasadniczą rolę podczas składania wirionu. Ponadto helisy  $\alpha$ 2 oraz  $\alpha$ 4 pełnią główną rolę w procesie wewnętrznej dimeryzacji nukleokapsydu [8,19,20]. Jak dotąd, nie zostało wyjaśnione, w jaki sposób dimery białka C są zorganizowane w obrębie nukleokapsydu [19]. Nukleokapsyd wirusa wykazuje skłonność do tworzenia agregatów nawet w obecności detergentów, co wskazuje, iż region hydrofobowy jest ekspozowany na powierzchni nukleokapsydu [23].

#### STRUKTURA GENOMU

Genom wirusa stanowi niesegmentowany, jednoniciowy RNA o dodatniej polarności [(+)ssRNA] i długości około 11 tys. nukleotydów (nt) (ryc. 4). Genomowy RNA jest zakaźny i może stanowić matrycę dla replikacji i transkrypcji białek wirusowych, jeśli zostanie wprowadzony do wrażliwych komórek [6]. Genom wirusa, o charakterze policistronowym, koduje trzy białka strukturalne (C, PrM i E) oraz siedem niestukturalnych NS (*non-structural*) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B i NS5) [16] (ryc. 4; tab. I). Koniec 5' genomu jest czapeczkowany przez strukturę *cap* typu 1 z 7-metyloguanozyną pełniącą istotną rolę w stabilizacji mRNA oraz w trakcie translacji [6,24]. Z kolei koniec 3' RNA TBEV, w przeciwieństwie do *Alphaviridae*, nie jest zakończony klasyczną sekwencją poli-A, a odmienną sekwencją określaną jako CU [8,18]. Oba końce genomowego RNA flankowane są przez regiony niekodujące UTR (*un-translated region*), tworzące II-rzędowe struktury uczestniczące w procesie translacji i replikacji [18]. Przy końcu 5' genomu UTR ma długość 130 nt [20]. Z kolei sekwencja 3'UTR, nawet wśród blisko spokrewnionych szczepów wirusa, ma bardziej zmienną długość mieszczącą się w zakresie 350–800 nt, co związane jest z obecnością w jej obrębie regionu zmiennego. RNA w obrębie UTR formuje II-rzędowe struktury typu „łodyżka i pętla” (*stem-loop*), które prawdopodobnie odgrywają istotną rolę w trakcie amplifikacji genomu wirusa, w procesie translacji oraz w trakcie składania wirionów potomnych [10]. Oba regiony UTR zawie-



**Ryc. 4.** Budowa genomu TBEV.

Jednoniciowy RNA o dodatniej polarności (+)ssRNA ma długość około 11 tys. nukleotydów (knt). Ma charakter policistronowy i koduje trzy białka strukturalne (C, PrM, E) oraz siedem niestrukturalnych NS (*non-structural*) (NS1–NS5). Na końcu 5' znajduje się struktura 7-metyloguanozyny (m<sup>7</sup>G), zaś koniec 3' zakończony jest sekwencją CU. Po obu końcach genomowego RNA obecne są regiony niekodujące UTR (*un-translated region*). Pomiędzy regionami UTR znajduje się pojedyncza otwarta ramka odczytu ORF (*open reading frame*) dla wszystkich białek wirusowych.

**Fig. 4.** The structure of the TBE virus genome.

The length of the single-stranded RNA of the positive polarity [(+)ss RNA] is about 11 thousands nucleotides (knt). It is polycistronic and encodes for three structural proteins (C, PrM, E) and seven non-structural NS proteins (NS1–NS5). The 7-methylguanosine structure (m<sup>7</sup>G) is found on the 5' end whereas the 3' end is finished by the CU sequence. The UTR (*un-translated region*) is present on each end of the genome. The single ORF (*open reading frame*) for all viral proteins is situated between the UTR regions.

rają konserwatywne sekwencje kontrolujące cykl replikacyjny wirusa. Pomiędzy regionami UTR znajduje się pojedyncza otwarta ramka odczytu ORF (*open reading frame*), kodująca pojedynczą poliproteinę (3414 aa), z której w trakcie obróbki potranslacyjnej z udziałem enzymów wirusowych i komórkowych formowane są funkcjonalne białka wirusa [8,10,25]. W pobliżu końca 5' występują geny kodujące białka strukturalne: C-PrM-E, z kolei w pobliżu 3'-końca znajdują się geny kodujące białka niestrukturalne NS w kolejności NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5 [8,26]. Białka NS1, PrM i E wycinane są przez enzymy komórkowe, podczas gdy uwalnianie białek C, NS2A, NS2B, NS3, NS4A i NS5 odbywa się z udziałem proteazy wirusowej. Z kolei białko NS4B odcinane jest od końca N przez proteazę wirusową, zaś od końca C – komórkową [5,27,28].

**CYKL REPLIKACYJNY**

Związanie TBEV z komórką ludzką zachodzi poprzez oddziaływanie osłonkowej glikoproteiny E wirusa z jak dotąd niepoznanymi receptorami obecnymi na powierzchni komórki gospodarza (ryc. 5). Do tej pory za potencjalne cząsteczki, mogące być receptorami komórkowymi uważa się fibronektynę (110 kDa), nieintegrynowy receptor lamininowy (67 kDa) oraz białko o masie 35 kDa [8]. Wydaje się, że

**Tabela I.** Rola białek niestrukturalnych TBEV w cyklu replikacyjnym

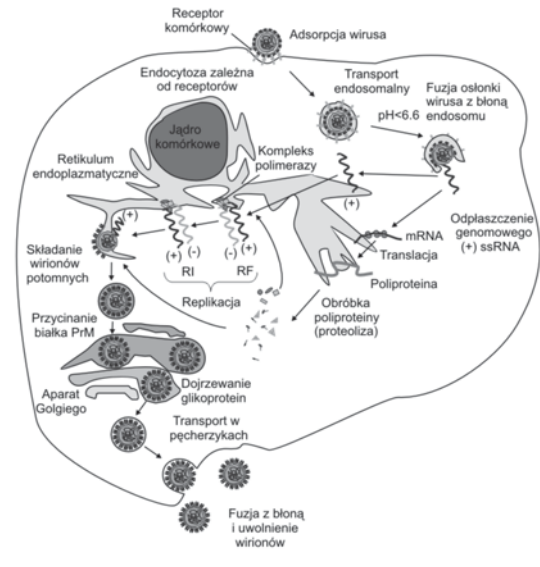
**Table I.** The role of TBE virus' non-structural proteins in the replication cycle

Białko	Wielkość	Funkcja
NS1	46 kDa (352 aa)	umożliwia wiązanie kompleksu replikacyjnego z błonami ER, tworząc kompleks z NS2A; odgrywa rolę we wczesnym stadium replikacji, wiążąc się z NS4A
NS2A	22 kDa, (230 aa)	wiąże kompleks replikacyjny z błonami ER; zaangażowane jest w proces składania wirionów potomnych
NS2B	14 kDa, (131 aa)	tworzy stabilny kompleks z NS3, stanowiąc kofaktor dla wirusowej proteazy
NS3	70 kDa, (621 aa)	odpowiada za replikację RNA (domena N-końcowa), w powiązaniu z NS2B; dzięki aktywności helikazy rozdziela potomne nici RNA od nici matrycowych, uczestnicząc w zapoczątkowaniu replikacji; poprzez aktywność trifosfatazy RNA (domena C-końcowa) uczestniczy w procesie „zapeczkowania” mRNA
NS4A	16 kDa, (149 aa)	uczestniczy w procesie replikacji, oddziałując z NS1; ma znaczenie dla odpowiedniego ułożenia przestrzennego kompleksu replikazy
NS4B	17 kDa, (252 aa)	wpływa na proces replikacji, oddziałując z NS3; ma znaczenie dla odpowiedniego ułożenia przestrzennego kompleksu replikazy
NS5	103 kDa, (903 aa)	posiada aktywność RNA-zależnej polimerazy RNA (domena C-końcowa), wraz z białkiem NS3 formuje kompleks polimerazy; posiada aktywność metylotransferazy (domena N-końcowa) – uczestniczy w procesie „zapeczkowania” mRNA

w procesie wiązania wirusa z komórką istotną rolę odgrywa siarczan heparanu (HS), glikozaminoglikan występujący w dużych ilościach na powierzchni komórek i w przestrzeniach międzykomórkowych kręgowców i kleszczy. Uważa się, że pełni on funkcję koncentrującą cząstki wirusa poprzez wiązanie ich na powierzchni komórki, ułatwiając późniejsze wiązanie ze specyficznymi cząsteczkami receptorów. Niektórzy badacze uważają, że sama interakcja z HS jest wystarczająca dla inicjacji wejścia wirusa do komórki [8,29]. Wirus wnika do komórki na drodze endocytozy zależnej od receptorów [6]. W wyniku tego procesu powstaje endosom, w którego wnętrzu w warunkach niskiego pH dochodzi do protonacji wysoce konserwatywnej reszty histydyny (His323) między I i II domeną glikoproteiny E, czego następstwem jest zmiana w konformacji białka E i jego reorganizacja z układu dimerów do trimerów. Okazało się, że postać trimeryczna glikoproteiny E jest bardziej stabilna termodynamicznie od dimeru, ponieważ jest formą o niższej energii. Uważa się, że energia swobodna uzyskana ze zmiany konformacji białka osłonki wykorzystywana jest w procesie fuzji osłonki wirusa z błoną endosomalną [16].

Determinantą fuzji jest eksponowany na tym etapie peptyd fuzyjny, obecny w domenie II glikoproteiny E. W efekcie nukleokapsyd uwolniony zostaje do cytoplazmy i dochodzi do odpłaszczania genomu wirusowego [6,8,19]. Genomowy (+)ssRNA TBEV jest zakaźny i służy jako mRNA. Na jego matrycy powstaje pojedynczy produkt w postaci dużej poliproteiny. Proteina prekursorowa kierowana jest do retikulum endoplazmatycznego (ER). Następnie wirusowe białko NS3, posiadające aktywność proteazy serynowej (NS3pro), wycina z poliproteiny kolejne białka wirusowe: C, NS2A, NS2B, NS3, NS4A i NS5. Proces ten zachodzi po stronie cytoplazmatycznej błony ER. Kofaktorem dla NS3 i elementem kotwiczącym w błonie ER jest białko NS2B [26,27,30]. Równocześnie, w świetle ER, z udziałem enzymów komórkowych ma miejsce wycinanie białek NS1, PrM i E. Z kolei białko NS4B, stanowiące domenę transbłonową, jest od strony cytoplazmatycznej (C-końca) odcinane przez proteazę wirusową, a od strony światła ER (N-końca) przez proteazę komórkową. Proces przycinania poliproteiny zachodzi w obrębie wykształcających się z ER zwiniętych fragmentów błon (*convoluted membranes* CM) i prowadzi do powstania funkcjonalnych białek wirusa. Wy-

jątek stanowią białko PrM i glikoproteina E, które ulegają obróbce i dojrzewaniu w późniejszych etapach cyklu replikacyjnego [27].



**Ryc. 5.** Cykl replikacyjny TBEV.

Osłonkowa glikoproteina E TBEV oddziałuje z receptorem komórkowym, po czym wirus wnika do komórki na drodze endocytozy. W następstwie fuzji osłonki z błoną komórkową nukleokapsyd zostaje uwolniony do cytoplazmy i wirusowy genom ulega odpłaszczaniu. Na matrycy genomowego (+)ssRNA (mRNA) powstaje pojedynczy produkt w postaci dużej poliproteiny, z której poprzez proteolityczne cięcia powstają białka wirusa. W procesie replikacji zachodzącej w okolicach błon retikulum endoplazmatycznego powstaje cząsteczka (-)ssRNA, która stanowi matrycę dla syntezy nici (+)ssRNA będącej genomem wirionów potomnych. W procesie składania wirionów potomnych formowany jest prekursor nukleokapsydu, który ulega wpączkowaniu do wnętrza retikulum, zyskując osłonkę. Następnie, po glikozylacji białka E i proteolizie prekursorowej proteiny PrM, dojrzewające wiriony transportowane są w pęcherzykach wydzielniczych i uwalniane poza komórkę na drodze egzocytozy.

**Fig. 5.** Replication cycle of the TBE virus.

Envelope glycoprotein E of the TBE virus interacts with the cellular receptor which is followed with the viral entry through endocytosis. The nucleocapsid is then released into the cytoplasm in a result of the fusion between the viral envelope and the cell membrane which is associated with the uncoating of the viral genome. The genomic (+)ssRNA (mRNA) is a translation template for a single product comprising a large polyprotein which is proteolytically cleaved resulting in viral proteins' formation. The (-)ssRNA is a product of replication occurring near endoplasmic reticulum membranes and is a template for the synthesis of the (+)ssRNA strand comprising the progeny virions' genome. The nucleocapsid's precursor is formed during progeny virions' assembly and is budded into the reticulum lumen reaching the envelope. Both E protein's glycosylation and PrM protein precursor's proteolysis takes place simultaneously. Maturing virions are subsequently transported through exocytic vesicles and then released outside the cell.

Synteza wirusowych białek enzymatycznych i regulatorowych umożliwia rozpoczęcie replikacji wirusowego RNA, zachodzącej w oko-



licach błon retikulum endoplazmatycznego. Proces ten poprzedzony jest utworzeniem kompleksu wirusowej replikazy (NS3/NS5), prawdopodobnie zawierającego także białka regulatorowe komórki. We wczesnym stadium tego procesu znaczącą rolę odgrywa białko NS1, ułatwiające wiązanie kompleksu replikazy z błonami ER. Kotwicząca rola białka NS1 możliwa jest dzięki jego połączeniu z innymi białkami niestrukturalnymi wirusa – NS2A i NS4A, natomiast białko NS4B ma znaczenie dla odpowiedniej orientacji przestrzennej kompleksu replikazy [19].

Replikację wirusowego RNA przeprowadza wysoce konserwatywne białko NS5, mające aktywność RNA-zależnej polimerazy RNA. Początkowym produktem replikacji jest dwuniciowa forma replikacyjna (*replicative form* – RF), zawierająca nici RNA o polarności dodatniej i ujemnej [19]. Wirusowe białko NS3, dzięki posiadanej aktywności helikazy RNA (NS3hel), rozdziela potomne nici (-)RNA od nici matrycowych poprzez rozluźnianie drugorzędowej struktury RNA w 3'-końcowym UTR. Następnym etapem replikacji jest powstanie intermediatu replikacyjnego (*replicative intermediate* – RI), w obrębie którego na bazie nici (-)ssRNA syntetyzowane są potomne nici RNA o polarności dodatniej. Cząsteczki potomnego RNA skupiają się w pobliżu powstających z aparatu Golgiego pęcherzyków o średnicy 70–100 nm występujących w tzw. pakietach (*vesicle packets* – VP) [24], przy czym nici (+) RNA gromadzone są z 10-krotnym nadmiarem w stosunku do ujemnych. Synteza wirusowego RNA jest więc procesem asymetrycznym. Powstałe nici genomowego RNA [(+)ssRNA] ulegają następnie modyfikacji w postaci dodania do 5'-końca struktury „czapeczki” (7-metyloguanozyny). W proces ten zaangażowane są prawdopodobnie wirusowe białka NS3 i NS5. Stwierdzono bowiem, że C-końcowa domena NS3 posiada aktywność fosfatazy RNA (odłączającej fosforan od 5-końcowego nukleotydu powstającego mRNA). Z kolei na N-końcu białka NS5 wykazano aktywność metylotransferazy, umożliwiającą metylację 5'-końcowego nukleotydu w pozycji N7 i O2' [27]. Powstające nici (+)ssRNA mogą stanowić matryce do dalszej replikacji, translacji lub ulegać pakowaniu do wirionów potomnych [6,25,27].

Składanie wirionów potomnych zachodzi w obrębie wewnątrzkomórkowego systemu błon aparatu Golgiego i ER, do którego błon

wbudowywane są glikoproteina E i białko PrM tworzące stabilne heterodimery. Proces składania wirionów wspomagany jest przez białko NS2A, dzięki któremu powstaje prekursor nukleokapsydu, w wyniku połączenia genomowego RNA z wysoce zasadowym białkiem C [31]. Następnie nukleokapsyd wpączkowuje do wnętrza retikulum, zyskując w ten sposób osłonkę. W aparacie Golgiego ma miejsce glikozylacja białka E. Ostatnim etapem dojrzewania wirionów jest obróbka posttranslacyjna prekursorowego białka M (PrM), polegająca na jego proteolitycznym przycinaniu przez komórkową proteazę furynową do proteiny M. Proces ten zachodzi stosunkowo późno, tuż przed uwolnieniem wirionów potomnych. Może to wynikać z istotnej funkcji tego białka w regulacji morfogenezy, przede wszystkim poprzez stabilizację wrażliwej na niskie pH domeny białka E. Zapobiega to przedwczesnej fuzji i agregacji wirionów podczas transportu przez kwaśne przedziały komórkowe [28,30]. Dojrzewające wiriony, obecne w pęcherzykach wydzielniczych, transportowane są na powierzchnię komórki, gdzie w wyniku egzocytozy uwalniane zostają poza komórkę [19,28].

Komórkami atakowanymi w pierwszej kolejności przez TBEV są obecne w skórze (lub w ścianie jelit) komórki Langerhansa. Wykazano, że innymi komórkami zakażanymi przez TBEV są makrofagi, neutrofile oraz komórki NK (*natural killers*). Po wnikięciu do organizmu TBEV zakaża krążące w krwiobiegu mieloidalne i plazmocytoidalne komórki dendrytyczne (*dendritic cells* – DC). W dalszej kolejności wirus atakuje komórki śródbłonka węzłów chłonnych i innych narządów (m.in. wątroby, śledziony i szpiku kostnego). Ostatecznym celem ataku TBEV są neurony ośrodkowego układu nerwowego [7].

W organizmie kleszcza TBEV zakaża komórki ścian środkowej części przewodu pokarmowego. Wirus przedostaje się następnie do komórek gruczołów ślinowych, gdzie zachodzi dalsze jego namnażanie. TBEV wydzielany jest wraz ze śliną, co umożliwia zakażenie kolejnego gospodarza podczas ugryzienia. Nie wyjaśniono dotąd, w jaki sposób TBEV utrzymuje się w organizmie kleszcza podczas zmiany stadium rozwojowego. Przypuszczać można, że wirus zakaża pewien typ komórek nieulegających histolizie. Wirus pozostaje w organizmie kleszcza przez całe jego życie, nie wywołując u niego zauważalnych zmian w jego tkankach [6].

Zróznicowaną patogenezę w TBEV w organizmie gospodarza i wektora wydaje się potwierdzać doświadczalne zakażenie linii komórkowych pochodzących od ssaków i kleszczy. W komórkach ssaków zmiany strukturalne, przerost i rozciągnięcie szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (*rough endoplasmic reticulum* – RER) oraz potomne cząstki wirusowe zaobserwowano po kilkunastu

godzinach, a maksymalny czas przeżycia zakażonych komórek wynosił 50 godzin od wprowadzenia wirusa. Z kolei w komórkach odkleszczowych potomne cząstki wirusowe stwierdzono dopiero po 24 godzinach od wprowadzenia wirusa. Zakażenie TBEV wywołało w komórce tylko niewielkie zmiany ultrastrukturalne, czego efektem było zakażenie przetrwałe [32].

## PIŚMIENNICTWO

- Lindquist L., Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *Lancet* 2008; 371: 1861–1871.
- Thiel H.J. i wsp. *Flaviviridae*. W: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. red. *Virus taxonomy – Classification and Nomenclature of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego 2005; 981–998.
- Grard G. i wsp. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: New insights into evolution, pathogenic determinants and taxonomy. *Virology* 2007; 361: 80–92.
- Süss J. Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-An overview. *Ticks Tick-borne Dis.* 2011; 1: 1–14.
- Mansfield K.L., Johnson N., Phipps L.P., Stephenson J.R., Fooks A.R., Solomon T. Tick-borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis. *J. Gen. Virol.* 2009; 90: 1781–1794.
- Dörrbecker B., Dobler G., Spiegel M., Hufert F.T. Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host. *Travel Med. Infect. Dis.* 2010; 8: 213–222.
- Mandl C.W. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Res.* 2005; 111: 161–174.
- Petri E., Gniel D., Zent O. Tick-borne encephalitis (TBE) trends in epidemiology and current and future management. *Travel Med. Infect. Dis.* 2010; 8: 233–245.
- Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. Tick-borne encephalitis. *Antivir. Res.* 2003; 57: 129–146.
- Donoso Mantke O., Schädler R., Niedrig M.A. A survey on cases of tick-borne encephalitis in European countries. *Euro Surveill.* 2008; 13 (17): 18848.
- Dobler G. Zoonotic tick-borne flaviviruses. *Vet. Microbiol.* 2010; 140: 221–228.
- Carpi G., Bertolotti L., Rosati S., Rizoli A. Prevalence and genetic variability of tick-borne encephalitis virus in host-seeking *Ixodes ricinus* in northern Italy. *J. Gen. Virol.* 2009; 90: 2877–2883.
- Kovalev S.Y., Chernykh D.N., Kokorev V.S., Snitkovskaya T.E., Romanenko V.V. Origin and distribution of tick-borne encephalitis virus strains of the Siberian subtype in the Middle Urals, the north-west of Russia and the Baltic countries. *J. Gen. Virol.* 2009; 90: 2884–2892.
- Robertson S.J., Mitzel D.N., Taylor T.T., Best S.M., Bloom M.E. Tick-borne flaviviruses: dissecting host immune responses and virus countermeasures. *Immunol. Res.* 2009; 43(1–3): 172–186.
- Heinz F.X. Molecular aspects of TBE virus research. *Vaccine* 2003; 21(1): 3–10.
- Chávez J.H., Silva J.R., Amarilla A.A., Moraes Figueiredo L.T. Domain III peptides from flavivirus envelope protein are useful antigens for serologic diagnosis and targets for immunization. *Biologicals* 2010; 38: 613–618.
- Sampath A., Padmanabhan R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral Res.* 2009; 81: 6–15.
- Lindenbach B.D., Thiel H.J., Rice C.M. *Flaviviridae: The viruses and their replication*. W: Fields Virology. Red. D.M. Knipe. Lipincott Company, Philadelphia 2007; 1101–1152.
- Suzuki Y. Multiple transmissions of tick-borne encephalitis virus between Japan and Russia. *Genes Genet. Syst.* 2007; 82: 187–195.
- Dokland T., Walsh M., Mackenzie J.M., Khromykh A.A., Ee K.H., Wang S. West Nile virus core protein; tetramer structure and ribbon formation. *Structure* 2004; 12: 1157–1163.
- Ma L., Jones C.T., Groesch T.D., Kuhn R.J., Post C.B. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Natl. Acad. Sci.* 2004; 101: 3414–3419.
- Mukhopadhyay S., Kuhn R.J., Rossmann M.G. A structural perspective of the *Flavivirus* life cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005; 3(1): 13–22.
- Pastorino B., Npugairče A., Wurtz N., Gould E., Lamballerie X. Role of host cell factors in *Flavivirus* infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. *Antiviral Res.* 2010; 87: 281–294.
- Bollati M. i wsp. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Res.* 2010; 87: 125–148.
- Schrauf S., Schlick P., Skern T., Mandl C.W. Functional Analysis of Potential Carboxy-Terminal Cleavage Sites of Tick-Borne Encephalitis Virus Capsid Protein. *J. Virol.* 2008; 82(5): 2218–2229.
- Assenberg R. i wsp. Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for poly-protein processing and viral replication. *J. Virol.* 2009; 83 (24): 12895–12906.
- Fernandez-Garcia M.D., Mazzon M., Jacobs M., Amara A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe.* 2009; 5 (4): 318–328.
- Kroschewski H., Allison S.L., Heinz F.X., Mandl C.W. Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus. *Virology* 2003; 308 (1): 92–2003.
- Fischl W., Elshuber S., Schrauf S., Mandl C.W. Changing the Protease Specificity for Activation of a Flavivirus, Tick-Borne Encephalitis Virus. *J. Virol.* 2008; 82 (17): 8272–8282.
- Kiermayr S., Kofler R.M., Mandl C.W., Messner P., Heinz F.X. Isolation of Capsid Protein Dimers from the Tick-Borne Encephalitis Flavivirus and In Vitro Assembly of Capsid-Like Particles. *J. Virol.* 2004; 78 (15): 8078–8084.
- Růžek D., Bell-Sakyl L., Kopecky J., Grubhoffer L. Growth of tick-borne encephalitis virus (European subtype) in cell lines from vector and non-vector ticks. *Virus Res.* 2008; 137 (1): 142–146.
- Lundkvist A. i wsp. Characterization of tick-borne encephalitis virus from Latvia: Evidence for co-circulation of three distinct subtypes. *J. Med. Virol.* 2001; 65 (4): 730–735.