

兔病毒性出血症病毒基因组结构与功能研究进展*

刘光清^{1**}, 云涛¹, 倪征¹, 张玉颖^{1,2}

(1.浙江省农业科学院 农业部病毒学与生物技术重点实验室, 浙江杭州 310021; 2.甘肃农业大学动物医学院, 甘肃兰州, 730070)

Progress on the Structure and Function of RHDV Genomes

LIU Guang-qing¹, YUN Tao¹, NI Zheng¹, ZHANG Yu-ying^{1,2}

(1. Key laboratory of Virology & Biotechnology of Agriculture Ministry, Zhejiang Academy of Agriculture Sciences, Hangzhou, 310021, China; 2. Animal Veterinary Medicine College, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

关键词: 兔病毒性出血症病毒; 基因组; 结构; 功能;

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)02-0194-06

兔病毒性出血症病毒 (*Rabbit hemorrhagic disease virus*, RHDV) 是一种对兔具有高度致病性和致死性的病毒, 所引发的疫病俗称“兔瘟”, 其病死率高达100%, 是一种对养兔业危害性比较严重的重要传染病。RHDV在分类地位上属于杯状病毒科 (*Caliciviridae*), 兔病毒属 (*Lagovirus*)。迄今所发现的RHDV均属于同一种血清型, 与杯状病毒科的其它成员, 如猫杯状病毒(FCV)、诺沃克病毒(NV)等没有交叉反应。除兔病毒属外, 杯状病毒科还含有其它三个属, 如诺沃克样病毒(Nrwalk-like virus, NLVs)、扎晃样病毒(Sporo-like virus, SLVs)和猫杯状病毒(*Feline calicivirus*, FCV)。在形态上, RHDV与其它杯状病毒科成员一样, 也是呈球型, 直径30nm左右, 无囊膜, 核衣壳呈20面体对称, 由32个颗粒组成, 在核衣壳上整齐地排列着中空的杯状结构。

RHDV的基因组为一条单股正链的RNA分子, 由约7437个核苷酸组成。基因组含有2个开放阅读框架(ORF): 其中ORF1编码一个大的多聚蛋白, 分子量约257kDa, 该蛋白可被进一步水解为至少8个重要蛋白其中7个主要蛋白的排列顺序为: NH₂-p11-p28-p35(NTPase)-p32-p14(VPg)-p70(Pro-Pol)-p60(VP1)-COOH。ORF2编码另一个结构蛋白(VP10)。基因组的5'末端共价结合一个分子量约15kDa的蛋白VPg, 3'端含有一个多聚腺嘌呤尾巴结构(poly(A))^[1]。本文拟就近年来对RHDV基因组功能学的研究成果作一综述。

1 非结构蛋白

研究表明RHDV感染细胞以后, 其病毒RNA首先翻译出一条多聚肽链, 然后由其自身编码的蛋白酶(3C-like蛋白酶)进一步裂解产生多个成熟的功能蛋白, Meyers等^[2]研究结果表明这些裂解产物至少含有8种蛋白, 分别是P16、P23、2C-like NTPase、P29、VPg、3C-like蛋白酶、RNA复制酶(RdRp)和VP60等, 其中2C-like蛋白酶、VPg、3C-like蛋白酶、RdRp和VP60的生物学功能已经得到初步鉴定, 其余蛋白的生物学功能还不清楚。

1.1 2C-like蛋白酶

Alonso等^[3]将RHDV的基因组与小RNA病毒的基因组进行比较分析发现p37与2C NTPase具有较高的序列同源性, 推测P37可能具有类似2C NTPase的功能。对P37的C-端氨基酸序列进行精细分析也发现该蛋白含有2个NTP-结合蛋白特有的保守序列: ₅₂₂GAPGIGKT₅₂₉ (A site)和₅₆₆DE₅₆₇ (B site), 其中A位点是NTP结合所必需的, B位点可以螯合Mg²⁺, 然后与结合在A位点的NTP形成磷酸盐化合物。此外, P37还含有位点C (₆₀₀KxxxFxSxxxxxS/TTN₆₁₄), 该基序与ATP的水解有关, 上述分析结果提示P37可能是解旋酶超家族III中的一个成员。Marin等^[4]用试验进一步证明了这种推测, 他采用定点突变技术将A位点中的Gly和Thr突变, 发现该蛋白的ATP结合能力及ATPase活性均丧失, 同样将B位点的Asp突变也将严重削弱ATPase的活性, 但是

收稿日期: 2005-10-26, 修回日期: 2005-12-19

基金项目: 浙江省自然科学基金资助(Y305047)

** 通讯作者: 刘光清(1968-), 安徽人, 副研究员, 研究方向为动物分子病毒学。

Corresponding author. Tel: 0571-86404241 Email: liuguangqing@hotmail.com;

却不影响ATP的结合活性。突变C位点中的保守性氨基酸(Asp)也将会抑制ATPase活性。

1.2 Vpg

杯状病毒的基因组是单股正链RNA分子具有mRNA分子的特征,但是它却没有mRNA分子特有的帽子结构,而是由一种称之为VPg的小蛋白分子与RNA分子的5'-末端共价结合。序列分析也表明杯状病毒基因组中也没有小RNA病毒所特有的内部核糖体进入位点(internal ribosomal entry site, IRES),但是杯状病毒基因组仍能进行正常复制,提示VPg可能在病毒RNA翻译起始过程中起重要作用。酵母双杂交实验结果表明VPg可以与宿主细胞中的翻译起始因子eIF3相互作用并形成复合物。如果将VPg缺失将会导致病毒感染性的丧失,同时也将使FCV的RNA翻译效率急剧下降。用蛋白酶K处理RNA也会得到类似地结果^[5]。令人惊讶是VPg竟然与真核细胞中翻译起始因子eIF1A具有序列相似性,以上证据提示VPg蛋白在病毒RNA的复制方以及蛋白质的合成方面可能起重要作用。RHDV的VPg由115个氨基酸组成,分子量在12-20kDa之间。Machin等^[6]证明RHDV的VPg是通过第21位Tyr的腺苷酰化与病毒RNA共价结合的。序列分析结果发现杯状病毒的VPg氨基酸序列中存在两个保守性基序(motifs):KKG(N/T)K和(D/E)EY(D/E)E,RHDV VPg的第21位关键氨基酸(Tyr)就位于后一基序中。Mitra等^[7]用定点突变方法分别在FCV感染性cDNA分子中将VPg的第12,24,76和104位的Tyr突变为Ala,结果发现VPg第24位酪氨酸的突变是致死性的,不能拯救出病毒,提示此Tyr₂₄是关键性氨基酸,FCV的VPg可能是通过它与病毒RNA形成共价键来结合的。

关于RHDV VPg的功能研究的还比较少,但是其它类似病毒VPg的功能已经得到初步揭示,如小RNA病毒中, RNA聚合酶(3D^{pol})首先将VPg尿苷酸化形成VPg-pU和VPg-pUpU,然后以此作引物合成病毒RNA^[8]。马铃薯Y病毒组的VPg可能与翻译、复制以及植物组织的长距离运动有关^[9],豇豆花叶病毒组的VPg在病毒感染过程中与正、负链RNA都共价相连,提示它与RNA的复制有关^[10]。

1.3 3C-Like蛋白酶

如前文所述,RHDV的基因组RNA含有一个长的编码框架(ORF1),它编码一个多聚蛋白,分子量约257kDa,该蛋白在随后的蛋白酶加工过程中分裂为各个成熟蛋白。而执行这一裂解过程的蛋白酶被称为3C-Like蛋白酶,因为它与小RNA病毒中

的3C-Like蛋白酶很相似,也是由病毒基因组自身编码。在多聚蛋白中已经鉴定出至少7个3C-Like蛋白酶特异性裂解位点(如图1所示)。这意味着3C-Like蛋白酶裂解的结果至少可以产生8个功能性蛋白。RHDV ORF1编码的聚合蛋白裂解的过程是首先裂解产生4个蛋白,其排列顺序为NH₂-p16-p60-p41-p72-VP60-COOH;然后VP60进一步产生p23和p37两种蛋白,其中p37类似于RNA病毒中的2C蛋白酶具有NTPase活性;同时p72裂解为p15和p58两种蛋白酶:即3C-Like半胱氨酸蛋白酶和RdRp;p41则裂解为p23和p18(或p29和p13)其中p13/p18是Vpg的前体,值得指出的是p41的裂解并不是3C-Like蛋白酶执行的,而是由一个尚未知的蛋白酶裂解^[11]。

3C-Like蛋白酶除了具有裂解聚合蛋白的功能外,可能还参与抑制宿主细胞蛋白的翻译过程。定点突变结果证明His₂₇, Asp₄₄和Cys₁₀₄是RHDV 3C-Like蛋白酶的活性位点^[12],这一特征位点在其它杯状病毒及小RNA病毒中也存在,表明其3C-Like蛋白酶具有类似的功能。小RNA病毒的3C-Like蛋白酶可以裂解宿主细胞中的poly(A)-结合蛋白(PABP),进而关闭细胞mRNA的翻译过程。那么杯状病毒的3C蛋白酶是否也具有抑制宿主细胞翻译的功能呢? Mitra等^[13]等的研究结果发现重组的FCV 3C-like蛋白酶可以在没有其它病毒蛋白存在的情况下裂解PAPB,将其裂解为C-端区域和N-端区域,由于PAPB C-端区域是eIF4B和eRF3结合的功能区域,N-端是PAPB与RNA结合的功能区,此两种功能区的分离导致细胞翻译过程被抑制。

1.4 RdRp

与其它正链RNA病毒一样,RHDV基因组也编码一种RNA聚合酶负责其自身基因组RNA的复制,这种聚合酶被称为RNA模板依赖性RNA聚合酶(RdRp)。已经证明体外表达的RdRp在有二价阳离子和核糖核酸存在的情况下,能够以RNA为模板合成子代RNA。目前,已经用X-射线技术得到了RHDV RdRp的晶体结构,其总体结构颇似人的一只“右手”,RdRp的2个拷贝分子在晶体结构中呈非对称性分布,提示在同一晶体结构中RdRp存在活性和非活性两种形态。指状区和掌形区构成一个相对严格的单元(rigid unit),拇指区则可以呈现或卷或伸两种构象。在这两种构象中,金属离子分别结合在不同的位置,提示RdRp结构的变化对于酶的活性可能很重要。

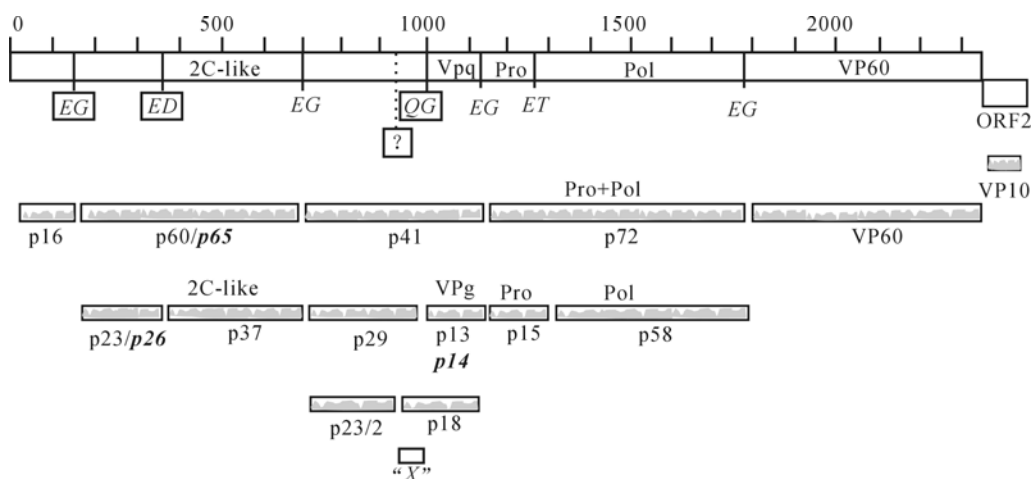


图1 RHDV 3C蛋白酶裂解位点及其裂解产物示意图^[14]

Fig 1 Schematic presentation of the RHDV-encoded proteins.

The so far determined processing sites are represented by vertical lines and the amino acids flanking the cleaved bond given in the one-letter code. Cleavage sites identified in the present study by mutation analysis are marked by a box. The site at the aminoterminal of p18 that has not yet been determined is indicated by (?). The bars below represent VP10 and the products resulting from processing of the ORF1-encoded polyprotein. The designation of proteins, which could only be demonstrated in extracts of infected hepatocytes but not after *in vitro* translation or transient expression, are written in bold letters. Please note that protein p5 represented by "X" has not been demonstrated.

尽管RHDV RdRp的序列与PV和HCV RdRp的序列同源性很低(分别为10%和20%),但是它们的总体结构却十分相似。RdRp的N-末端区域(第1-63位氨基酸)含有2个 α 片层结构和3个长环状结构。其中一个 α 片层与“指形”区域的一个 α 片层结构配对,另一个 α 片层结构与“拇指形”区域的 α 片层结构配对。这一功能区将不能直接相互作用的“拇指”区和“指形”区连接起来。晶体结构中不对称分布的RdRp的2个拷贝分子之间在N-端也存在显著的构象差异,尤其是在第21-24位、第51-64位氨基酸之间。这种构象上的差异依赖于相邻晶格之间的相互联系。“指形”区(第64-215位和第259位-312位氨基酸)含有8个 α -螺旋和1个5股的 β -片层结构。RHDV RdRp的指状区具有一个独特的特点,即在第259-289位氨基酸之间有1个HLH(helix-loop-helix)结构单元。“掌形”区(第216-258位和第312位-259位氨基酸)含有一个3股的 β -片层和2个 α -螺旋结构,并形成“三明治”样构象,这一特点在所有的RdRp中都高度保守。目前,在RdRp中已经鉴定出6个重复基序,与NTP的结合及催化作用有关。“拇指”区域(第418-501位氨基酸)含有4个 α -螺旋结构和2个长的环状结构。第一个长环状结构(第428-446位氨基酸)将第一个 α -螺旋与第二个 α -螺旋连接,并折叠起来远离活性中心。第二个长环状结构(第483-489位氨基酸)将第三个 α -螺旋与

第四个 α -螺旋连接,利于RdRp利用双股RNA作为模板^[15]。

2 RHDV的结构蛋白

2.1 VP60

RHDV ORF1编码的多聚蛋白被3C-Like蛋白裂解后释放出一个分子量约60kDa的蛋白。该蛋白是RHDV的主要结构蛋白(VP60),VP60的立体结构由180个完全相同的亚单位组成,如此多的亚基之间相互作用,然后形成具有三维构象的衣壳。该组装过程与各个亚基的N端序列有关,因为将该区段缺失后,VP60就再不能装配成空衣壳^[17]。RHDV在宿主细胞中完成一个复制周期后,由VP60组装的空衣壳将子代vRNA包裹形成成熟的病毒粒子,然后随着细胞的裂解释放出来,侵染其它的敏感细胞。大量研究结果证明RHDV的衣壳蛋白与病毒的致病性和免疫原性密切相关。国内、外的学者使用不同的表达系统成功表达了VP60,用表达产物接种兔子可以诱导产生较强的免疫应答,并能对抗RHDV的攻击^[18]。研究发现,单独表达的VP60可以形成空衣壳(virus-like particles, VLPs),能够模拟完整病毒粒子诱导宿主的免疫系统,这一发现为研制RHDV的新型疫苗奠定了基础。鉴于VP60可以单独形成VLPs,拥有立体构象,而且VP60的N端42个氨基酸即使缺失掉也不会影响其包装功能,因

此人们尝试用它作为基因转移载体来表达外源基因。如Mehdaoui等^[19]将人乳头状瘤病毒(HPV)的L1蛋白融合于VP60的N端,结果重组的VP60可在昆虫细胞中表达并装配成VLPs,其大小与自然RHDV的VLPs很相似。最近,Farnós等^[20]

用毕赤酵母高效表达了RHDV AST/89株的VP60,将其与弗氏不完全佐剂联合免疫兔子,不仅可以刺激机体产生高水平的病毒特异性抗体,而且可以对抗攻毒剂量达100 LD₅₀同型病毒的攻击,显示了很好的应用前景。

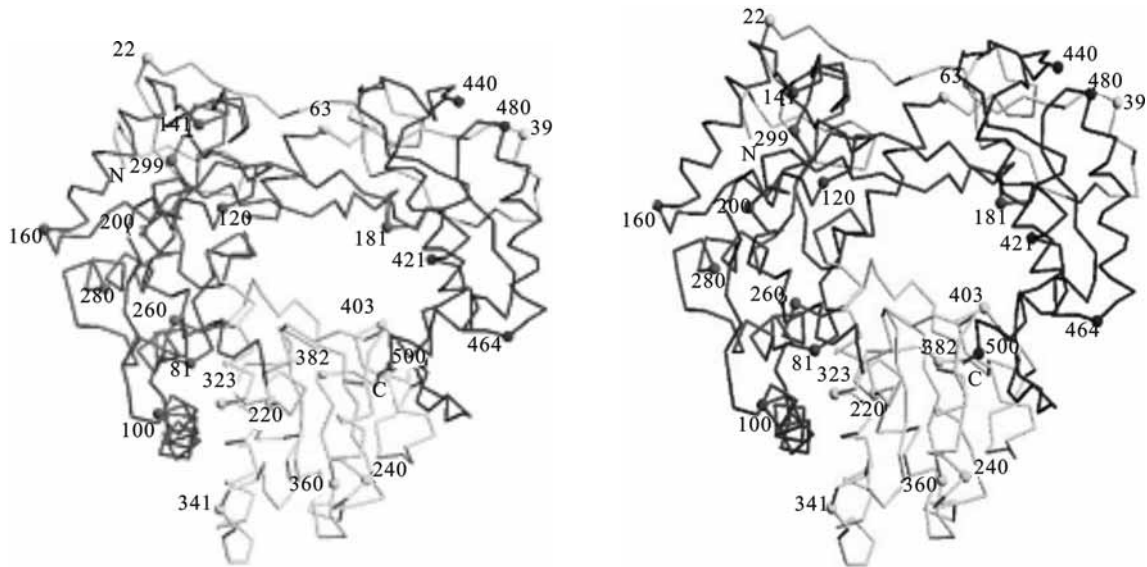


图2 RHDV RdRp的晶体结构示意图^[16]

Fig. 2 Sketch map of the crystal structure of RHPV RdRp

N-terminal region, yellow; fingers domain, red; fingers insert, magenta; N-terminal part of palm domain, green; C-terminal part of palm domain, cyan; thumb domain, blue.

2.2 VP10

VP10由RHDV基因组的3'端的ORF2所编码,其翻译效率只有ORF1的约20%。ORF1的终止密码子的存在对于VP10的表达很关键,ORF2的起始密码(AUG)位于ORF1终止密码的前3~5位核苷酸。将ORF1的大部分序列缺失或替换后对ORF2的表达没有明显影响。但是ORF1 3'端的84个核苷酸对VP10的表达却很关键。研究现象还显示VP10即使在没有起始密码存在的情况下也可以表达,甚至用外源基因将ORF2的序列几乎全部替换也不影响其翻译。推测可能ORF2的翻译并不依赖于起始密码(AUG)的存在,而要求起始位点上游的某序列元件必须存在^[21]。

目前关于RHDV VP10的生物学功能还不清楚,但是杯状病毒科其它成员的一些研究结果也许会给我们一些启示,如诺沃克病毒(NV) VP10不仅具有调节衣壳蛋白(VP1)表达功能,而且可以提高VP1的稳定性,使它避免被蛋白酶降解^[22]。进一步的研究表明ORF3(相当于RHDV的ORF2)序列中第108位~第152位氨基酸与ORF3~ORF2蛋白质之间

的相互作用有关。Sosnovtsev等^[23]的研究结果证明FCV相应编码框的缺失将使病毒丧失感染性,说明该蛋白对于病毒粒子的产生与成熟很关键。

3 亚基因组(subgenomic mRNA, sgRNA)

在RHDV感染的细胞中除了产生全长基因组RNA外,还可以产生一条长约2.2kb的RNA分子,与完整基因组3'端1/3的序列一致,5'端也与一个VPg分子共价连接。该RNA的表达产物与VP60相同,是RHDV的衣壳蛋白(VLPs),人们称这种RNA分子为亚基因组。这种现象在其它病毒(如动脉炎病毒)中也存在。Meyers等利用蔗糖密度梯度离心、病毒抗原试验以及核酸分子杂交等实验证实RHDV病毒基因组和亚基因组RNA可以分别包装成病毒颗粒。郑东等^[24]用低温电镜技术为RHDV在复制过程中,其7.5kb基因组和2.2kb亚基因组RNA可分别包装成病毒颗粒提供了结构证据。

SgRNA产生的机制可能有两种: (1)在负链RNA(以基因组RNA为模板合成)上存在sgRNA的内在启动子, 然后以负链RNA为模板合成截短的正链RNA(即sgRNA)^[25]; (2)负链RNA的合成提前终止产生截短的sgRNA。Morales等^[26]证明RHDV sgRNA的产生是采用的第一种策略, 其内部启动子为sgRNA合成其始位点上游的约50和核苷酸序列。

4 结语

RHDV作为杯状病毒科中一个较新的成员, 其基因组结构与功能尚有许多未解之谜。如ORF1编码的聚合蛋白裂解后可产生至少10种蛋白, 除2C-like蛋白酶, VPg, 3C-like蛋白酶, RdRp以及VP60得到初步鉴定外, 其它一些蛋白的详细功能尚有待于深入研究; ORF2编码产物具有什么样的生物学功能? 它与ORF1编码产物之间关系如何? 它的存在与否对病毒的感染与复制有影响么? 基因组非编码区(Non Coding Region, NCR)的结构特点及生物学意义如何? 基因组中哪些位点与病毒的致病性有关? 病毒的受体是什么? 它又是如何侵染宿主细胞的? 自RHDV被发现之日起, 20余年过去了, RHDV的这些问题至今没有被解决。究其原因可能与以下两个因素有关(1)至今没有建立RHDV稳定的细胞培养模型;(2)缺少一个可供在DNA水平上操作的技术平台。

References

- [1] Ushijima H, Miyamura T, Takeda N. Proteolytic Processing of Sapovirus ORF1 Polyprotein [J]. *J Virol*, 2005, 79 : 7283 - 7290.
- [2] Meyers G, Wirblich C, Thiel H J, *et al.* Rabbit Hemorrhagic Disease Virus: Genome Organization and Polyprotein Processing of a Calicivirus Studied after Transient Expression of cDNA Constructs [J]. *Virology*, 2000, 276:349-363.
- [3] Alonso J M, R Casais, J A Boga, *et al.* Processing of rabbit hemorrhagic disease virus polyprotein [J]. *J Virol*, 1996, 70: 1261-1265.
- [4] Marín M S, Casais R., Alonso J M, *et al.* ATP Binding and ATPase Activities Associated with Recombinant Rabbit Hemorrhagic Disease Virus 2C-Like Polypeptide [J]. *J Virol*. 2000, 74:10846-10851.
- [5] Lellis A D, Kasschau K D, Whitham S A, *et al.* Carrington Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF (iso) 4E during potyvirus infection [J]. *Curr. Biol*, 2002, 12: 1046-1051.
- [6] Daughenbaugh K F, Fraser C S, Hershey J W B, *et al.* The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment [J]. *EMBO J*, 2003, 22: 2852-2859.
- [7] Mitra T, Sosnovtsev S V, Green K Y. Mutagenesis of Tyrosine 24 in the VPg Protein Is Lethal for Feline Calicivirus [J]. *J Virol*, 2004, 78: 4931-4935.
- [8] Paul A V, J Hvan Boom, D Filippov, *et al.* Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase [J]. *Nature*, 1998, 393: 280-284.
- [9] Lellis A D, Kasschau K D, Whitham S A, *et al.* Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF (iso) 4E during potyvirus infection [J]. *Curr Biol*, 2002, 12: 1046-1051.
- [10] Lomonosoff G, Shanks M, Evans D. The structure of cowpea mosaic virus replicative form RNA [J]. *Virology*, 1985, 144 : 351-362.
- [11] Thumfart J O, Meyers G. Rabbit Hemorrhagic Disease Virus: Identification of a Cleavage Site in the Viral RNA That Is Not Processed by the Known Calicivirus Protease [J]. *Virology*, 2002, 304 : 352-363.
- [12] Boniotti B, Wirblich C, Sibilina M, *et al.* Identification and characterization of a 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus [J]. *J Virol*, 1994, 68: 6487-6495.
- [13] Mitra T, Sosnovtsev S V, Green K Y. Mutagenesis of Tyrosine 24 in the VPg Protein Is Lethal for Feline Calicivirus [J]. *J Virol*, 2004, 78: 4931-4935.
- [14] Meyers G, Wirblich C, Thiel H J, *et al.* Rabbit Hemorrhagic Disease Virus: Genome Organization and Polyprotein Processing of a Calicivirus Studied after Transient Expression of cDNA Constructs [J]. *Virology*, 2000, 276:349-363
- [15] López Vázquez, A Martín Alonso J M, Parra F. Characterisation of the RNA-dependent RNA polymerase from Rabbit hemorrhagic disease virus produced in *Escherichia coli* [J]. *Arch. Virol.* 2001, 146:59-69.
- [16] Ng K K, Cherney M M, Vazquez A L, *et al.* Crystal structures of active and inactive conformations of a caliciviral RNA-dependent RNA polymerase [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 : 1381-1387.
- [17] Bárcena J, Verdaguier N, Roca R, *et al.* The coat protein of Rabbit hemorrhagic disease virus contains a molecular switch at the N-terminal region facing the inner surface of the capsid [J]. *Virology*, 2004, 322 : 118-134.
- [18] Bárcena J, Morales M, Vázquez B, *et al.* Horizontal Transmissible Protection against Myxomatosis and Rabbit Hemorrhagic Disease by Using a Recombinant Myxoma Virus [J]. *J Virol*. 2000, 74 : 1114-1123.

- [19] El Mehdaoui S, Touze' A, Laurent S, *et al.* Gene transfer using recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsids with genetically modified DNA encapsidation capacity by addition of packaging sequences from or L2 protein of human papillomavirus type 16 [J]. *J Virol*, 2000, 74 : 10332-10340.
- [20] Farnós O, Boué O, Parra F, *et al.* High-level expression and immunogenic properties of the recombinant rabbit hemorrhagic disease virus VP60 capsid protein obtained in *Pichia pastoris* [J]. *J Biotech*, 2005, 117 (3) : 215-224.
- [21] Meyers G. Translation of the minor capsid protein of a calicivirus is initiated by a novel termination-dependent reinitiation mechanism [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278:34051-34060.
- [22] Bertolotti-Ciarlet A, Crawford S E, Hutson A M, *et al.* The 3' End of Norwalk Virus mRNA Contains Determinants That Regulate the Expression and Stability of the Viral Capsid Protein VP1: a Novel Function for the VP2 Protein [J]. *J Virol*, 2003, 77: 11603 - 11615.
- [23] Sosnovtsev S V, Belliot G, Chang K O, *et al.* Feline Calicivirus VP2 Is Essential for the Production of Infectious Virions [J]. *J Virol*, 2005, 79: 4012-4024.
- [24] Zheng D, Chen D, ue T, (郑 东, 谏东华) *et al.* Visualization of RHDV particles packaging genomic and subgenomic RNAs by electron cryomicroscopy [J]. *Chine Elec Micros Soc (电子显微学报)*, 2000, 19 : 660-666.
- [25] Meyers G. Translation of the Minor Capsid Protein of a Calicivirus Is Initiated by a Novel Termination-dependent Reinitiation Mechanism [J]. *J Biol Chem*, 2003, 36:34051-34060.
- [26] Morales M, Bárcena J, Ramírez M A, *et al.* Torres. Synthesis in Vitro of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus Subgenomic RNA by Internal Initiation on (-) Sense Genomic RNA [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 17013-17018.