

## **F: Zusammenfassung**

In dieser Arbeit sollten unter Verwendung einer neu entwickelten Methode der multiplen Festphasen-Peptidsynthese lineare antigene Determinanten auf Proteinen des Virus der bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) identifiziert werden. Diese Determinanten sollten zur Entwicklung eines Testsystems auf Peptidbasis zum Nachweis von BVDV-spezifischen Antikörpern in Feldseren verwendet werden. Weiterhin sollte das P-Protein des Virus der Seehundstaupe, "phocid distemper virus "(PDV), auf das Vorhandensein linearer B-Zell-Determinanten untersucht werden.

Die Peptidsynthese erfolgte auf Trägern aus Cellulosemembranpapier. Mit diesen wurde ein indirekter Enzym-Immuntest (EIA) durchgeführt, um die Bindung von Antikörpern (AK) an Peptide nachzuweisen. Zunächst wurden die Bedingungen für den EIA optimiert, da in Vorversuchen starke Hintergrundreaktionen beobachtet wurden, die eine eindeutige Ergebnisinterpretation nicht zuließen. Es wurden Peptidträger mit definierten Peptiden hergestellt, gegen die ein definierter monoklonaler Antikörper (mAK) und zwei in Kaninchen erzeugte Seren verfügbar waren. Die Eignung verschiedener Sättigungspuffer wurde geprüft, die Peptidträger gegenüber unspezifischen Bindungen abzusättigen. Mehrere Enzym-Konjugate mit Anti-Spezies- $\gamma$ -Immunglobulin (IgG)-AK wurden auf ihre mögliche Verwendung zum spezifischen Nachweis der an die Peptide gebundenen AK verschiedener Spezies untersucht.

Bei Verwendung eines bovines Serumalbumin enthaltenden Sättigungspuffers in Kombination mit anti-Spezies-IgG-AK/Alkalische Phosphatase-Konjugaten wurde es möglich, spezifische Reaktionen von mAK eindeutig zu lokalisieren. Durch Absättigung der Peptidträger mit einem Hühner-Ovalbumin enthaltenden Puffer gelang es, unspezifische Bindungen an Peptide soweit zu reduzieren, daß sich spezifische Reaktionen der Antipeptidseren mit entsprechenden Peptiden deutlich von unspezifischen abhoben. Es gelang aber auch mit diesem Puffer nicht, Bindungen polyklonaler Seren so weit zu reduzieren, daß eine zweifelsfreie Unterscheidung von spezifischen und unspezifischen Reaktionen möglich wurde.

Für die systematische Suche nach erregerspezifischen linearen Determinanten wurden Proteinsequenzen in Form von 13-er Peptiden synthetisiert, die sich in jeweils 10 Aminosäuren (AS) überlappten. Auf diese Weise wurden Peptidträger hergestellt, die die Sequenzen der Proteine p14, p20, gp53, p80/125 und carboxyterminale Teile des gp48 des BVDV-Stammes NADL sowie des P-Proteins des PDV-Stammes 2558/Han darstellten.

Diejenigen Peptidträger, die BVDV-spezifische AS-Sequenzen darstellten, wurden in EIA mit BVDV-spezifischen mAK, BVDV-seropositiven Rinder- und Schweineseren auf Bindung BVDV-spezifischer AK an die Peptide untersucht. Als negative Kontrollen dienten Seren nicht-infizierter Tiere bzw. Präimmunsereen. Keiner der 32 verwendeten mAK reagierte im EIA mit einem der Peptide. Die mit polyklonalen Rinder- und

Schweineseren beobachteten Reaktionen konnten nicht eindeutig auf BVDV-spezifische AK zurückgeführt werden, da sie auch in EIA mit den Kontrollseren auftraten.

Vierzehn mAK, vier davon spezifisch für das P-Protein von PDV, zehn für das des Virus der Hundestaupe ("canine distemper virus", CDV), wurden in EIA auf ihre Bindung an PDV-sequenzspezifische Peptide untersucht. Acht der mAK reagierten nicht mit den Peptiden. Fünf mAK, von denen vier der durch Konkurrenzexperimente definierten CDV-Domäne 1 zugeordnet waren, reagierten mit vier aufeinanderfolgenden Peptiden, die die AS 382-403 des PDV-P-Proteins darstellten. In weiteren Untersuchungen konnte die lineare Determinante auf den Bereich der AS 390-395 eingegrenzt werden. Ein weiterer mAK, dessen Bindungsstelle der CDV-Domäne 4 zugeordnet worden war, reagierte mit einer am Aminoterminal des Proteins lokalisierten Determinante im Bereich der AS 18-24. Versuche mit PDV-spezifischen Schweineseren sowie mit CDV-spezifischen Hundeseren gaben Hinweise auf das Vorhandensein weiterer linearer Determinanten auf dem P-Protein dieser Viren.

Martens, Ernst Wolfram

Identification of linear epitopes on proteins from pesti- and morbilliviruses by using sequence specific, synthetic oligopeptides.

### G. Summary

The aim of this work was the identification of linear antigenic determinants on proteins from bovine viral diarrhoe virus (BVDV) by using a newly developed method for multiple solid phase peptide synthesis. The determinants should then be used for the development of a peptide-based enzyme linked immunosorbent assay for screening for BVDV-specific antibodies in field sera. In addition, linear antigenic determinants should be identified on the P-protein from phocid distemper virus (PDV) of seals.

Cellulose-membrane sheets were used as solid supports for peptide synthesis. For detecting antibody (Ab) binding to peptides an indirect enzyme immunoassay (EIA) was performed. In the preliminary EIAs high background reactions of all sera tested made the interpretation of results impossible. For optimizing EIA conditions, carriers with peptides against which a defined monoclonal antibody (mAb) and two specific

rabbit sera were available were prepared. Different blocking buffers were tested for their ability to reduce unspecific bindings, and a series of anti-species  $\gamma$ -immunoglobuline (IgG) Abs conjugated to enzymes were tested for their ability to specifically detect Abs bound to peptides.

Peptides specifically bound by mAbs were clearly identified when a blocking buffer containing bovine serum albumine (BSA) in combination with anti-mouse IgG Abs conjugated with alkaline phosphatase were used. Peptides specifically bound by the rabbit sera were best visible when the blocking buffer contained chicken ovalbumine instead of BSA. By using the ovalbumine buffer, high background reactions obtained with virus-specific polyclonal sera from cattle and pigs could be reduced, but it was impossible to differentiate between virus-specific and unspecific Ab binding, as both positive and negative sera reacted with the peptides.

For systematic search for linear antigenic determinants peptides with 13 amino acids (AS) with 10 overlapping with the first ones of the next peptide were synthesized. Membrane carriers containing sequences representing the BVDV, strain NADL proteins p14, p20, gp53, p80/125 and the carboxyterminal part of gp48 were prepared. The P-protein from PDV, strain 2558/Han was synthesized analogously.

Peptidcarriers which represented BVDV-specific sequences were tested in EIAs using BVDV-specific mAbs and sera from cattle and pigs infected with BVDV. As negative controls, sera from uninfected animals or pre-immune sera were tested. None of the 32 mAbs tested for reactivity with the peptide carriers gave a positive result. Reactions with polyclonal sera from cattle and pigs, respectively, could not be attributed to BVDV-specific Abs, as they were also seen with negative sera.

The reactivity of the peptides representing the P-protein from PDV were tested in EIAs using 4 PDV- and 10 canine distemper virus (CDV)-specific mAbs. Five of these reacted with a series of four consecutive peptides containing AS 382-403 of the PDV-P-protein. Four of the mAbs had been shown to react with the antigenic CDV domain 1 by competition experiments. The identified linear determinant was mapped on AS 390-395. An additional mAb, specific for the CDV-domain 4, bound to three peptides near the aminoterminal end of the protein. The determinant was located at AS 18-24. The remaining mAbs showed no reactivity. EIAs using PDV-specific porcine sera as well as CDV-specific canine sera showed evidence for the existence of further linear antigenic determinants on the P-protein of both viruses.