

5 Zusammenfassung

Die ruminanten Pestiviren werden nach heutiger Kenntnis durch das Virus der bovinen Virus-Diarrhöe (BVDV) und durch das "Border Disease"-Virus (BDV) der Schafe repräsentiert. Mit dem Virus der klassischen Schweinepest (CSFV) bilden sie das Genus Pestivirus innerhalb der Familie *Flaviviridae*. Das RNA-Genom der Pestiviren kodiert für ein Polyprotein von etwa 4000 Aminosäuren, aus dem die reifen Virusproteine durch ko- und posttranslationale Spaltungen hervorgehen. Bei den Pestiviren sind die Strukturproteine im N-terminalen Drittel des Polyproteins im Anschluß an die Autoprotease N^{pro} lokalisiert. Die Strukturproteine werden durch das Kapsidprotein C und die drei Glykoproteine E0, E1 und E2 repräsentiert. Dem E2 kommt aufgrund seiner Fähigkeit, neutralisierende Antikörper zu induzieren, besondere Bedeutung zu. Es gilt gegenwärtig als vielversprechender Kandidat für die Impfstoffentwicklung.

Als Voraussetzung für weitere Analysen wurde zunächst eine cDNA-Klonierung und die Bestimmung der Nukleotidsequenz der Strukturproteingene von BVDV CP7 durchgeführt. Ausgehend von den cDNA-Klonen und der vorgeschlagenen Genomlokalisierung der Strukturproteine von BVDV CP7 erfolgte die Expression der BVDV-Strukturproteine im Vaccinia-Virussystem. Hierbei wurden Konstrukte hergestellt, die N^{pro} und den gesamten Strukturproteinbereich (VacBVD3.6), die drei Glykoproteine (VacBVD2.7), das E0 (VacBVDE0) oder das E2 (VacBVDE2) exprimierten. Bei einer weiteren Rekombinante wurde ausgehend von VacBVD3.6 der für das E2 kodierende Bereich deletiert (VacBVD2.1). Die Analyse der von den rekombinanten BVDV/Vaccinia-Viren exprimierten BVDV-Proteine durch Immunpräzipitationen zeigte, daß N^{pro}, C und die drei Glykoproteine weitgehend authentisch prozessiert und modifiziert wurden. E0-Homodimere, E2-Homodimere und E1/E2-Heterodimere konnten ebenso nachgewiesen werden wie die Sekretion des E0 in den Überstand. Die Expression im Vaccinia-Virussystem ermöglicht zum einem weiterführende Studien zur Biosynthese der Strukturproteine von BVDV. Zum anderen kann die Immunogenität der einzelnen rekombinanten BVDV/Vaccinia-Viren im Tier geprüft werden. Als Alternative zu rekombinanten, vermehrungsfähigen Vaccinia-Viren wurde auch das Modell einer "subunit"-Vakzine entwickelt. Hierfür erfolgte die Expression des BVDV E2 via

rekombinantes Bakulovirus in Insektenzellen. Das rekombinante BVDV E2 zeigte bezüglich Größe, Glykosylierung und Dimerisationsverhalten weitgehende Übereinstimmung mit dem BVDV E2 aus CP7-infizierten Zellen. Aufgrund der hohen Expressionsstärke eignet sich das via rekombinantes Bakulovirus exprimierte E2 besonders für die Reinigung und kann im Tier auf die Induktion einer protektiven Immunität geprüft werden.

Die einzelnen Vertreter der Pestiviren sind serologisch eng miteinander verwandt. Während CSFV von BVDV und BDV sicher abgegrenzt werden kann, war eine eindeutige Unterscheidung zwischen BVDV und BDV bislang nicht möglich. Zur Charakterisierung von BDV wurden von drei definierten Pestivirusisolaten aus Schafen die für die Glykoproteine E1 und E2 kodierenden Bereiche kloniert und sequenziert. Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von E1 und E2 dieser drei ovinen Isolate mit den entsprechenden Sequenzen von BVDV und CSFV zeigte, daß es zumindest zwei verschiedene Gruppen oviner Pestiviren gibt. Die eine Gruppe wird repräsentiert durch BVDV-ähnliche Stämme (R2727), die andere durch "echte" BDV-Stämme (X818, L83/84). Letztere unterscheiden sich eindeutig von BVDV sowie auch von CSFV.

Die Darstellung der RNA und der Nachweis der viruskodierten Proteine von BDV X818 war ein weiteres Ziel dieser Arbeit. "Northern Blot"-Analysen zeigten, daß die RNA bei den drei ovinen Isolaten etwa 12,5 kB groß ist. Nach Infektion von Zellen mit dem "echten" BDV-Stamm X818 konnten durch Immunpräzipitationen N^{pro}, C, E0, E1, E2, p125, p10, p30 und das C-terminale Spaltprodukt der mutmaßlichen Polymerase identifiziert werden. Die Größe der RNA, die vergleichende Sequenzanalyse sowie die Analyse der viruskodierten Proteine legen nahe, daß die für BVDV und CSFV vorgeschlagene Genomorganisation auch für BDV zutrifft.

Auf der Grundlage dieser Untersuchungen können die beiden Gruppen oviner Pestiviren künftig unterschieden werden. Diese Ergebnisse sind somit für Diagnose, Epidemiologie und Impfstoffentwicklung von großer Bedeutung.

6 Summary

Paul Becher: Molecular characterization of ruminant pestiviruses

Ruminant pestiviruses are represented by bovine viral diarrhea virus (BVDV) and "border disease" virus (BDV) from sheep. Together with classical swine fever virus they form the genus pestivirus within the family *Flaviviridae*. The genomic RNA of pestiviruses encodes a polyprotein of approximately 4000 amino acids, which is co- and posttranslationally processed into the mature viral proteins. The first protein of the polyprotein, a nonstructural autoprotease (N^{pro}) is followed by the structural proteins. The latter are represented by the nucleocapsid protein (C) and the three glycoproteins (E0, E1 and E2). Glycoprotein E2 is of particular interest, because it induces neutralizing antibodies; it is currently the most promising candidate for vaccine development.

As a prerequisite for the expression of BVDV structural proteins cDNA cloning and nucleotide sequencing of the genomic region encoding the structural proteins of BVDV strain CP7 were performed. According to the proposed genomic localisation of the structural proteins of BVDV CP7, these proteins were expressed by recombinant vaccinia viruses. Following constructs were generated, which led to expression of BVDV-specific proteins indicated in brackets. (1) VacBVD3.6 (N^{pro} together with all structural proteins), (2) VacBVD2.1 (N^{pro} , C, E0 and E1), (3) VacBVD2.7 (E0, E1, E2), (4) VacBVDE0 (E0), (5) VacBVDE2 (E2). Immunoprecipitation analyses of the BVDV proteins expressed by these vaccinia viruses led to identification of N^{pro} , C and the three glycoproteins. Processing and modification of these recombinant proteins appeared to be largely authentic. With regard to BVDV glycoproteins an E0 homodimer, an E2 homodimer and an E1/E2 heterodimer were clearly detectable as well as secretion of E0 into the medium. Expression by vaccinia viruses allows further studies of the biosynthesis of BVDV structural proteins. In addition the recombinant BVDV/Vaccinia viruses can be examined in the animal with respect to their immunogenicity. Alternatively to live recombinant vaccinia viruses a model for a 'subunit' vaccine has been proposed. According to this model BVDV E2 has been expressed via a recombinant baculovirus. The apparent molecular weight, glycosylation and dimerization of

recombinant BVDV E2 demonstrated, that it largely resembles BVDV E2 from BVDV CP7-infected cells. BVDV E2 expressed via recombinant baculovirus is particularly suited for protein purification, because of the high expression level. Purified BVDV E2 can be examined in the animal with respect to its ability to induce a protective immunity.

Members of the genus pestivirus are serologically closely related. While CSFV can be clearly distinguished from BVDV and BDV, so far a clear differentiation between BVDV and BDV has not been accomplished. For characterization of BDV the regions encoding E1 and E2 of three serologically defined ovine pestivirus isolates were cloned and sequenced. Comparison of the deduced amino acid sequences of E1 and E2 of these three strains with the respective sequences of other pestiviruses demonstrated, that there are two distinct groups of sheep-derived pestiviruses; one is represented by BVDV-like strains (R2727) while the other is formed by "true" BDV strains (X818, L83/84). "True" BDV strains are clearly different from both BVDV and CSFV. They form a third separate group within the genus pestivirus.

Identification of BDV RNA and of BDV-encoded proteins were further subjects of the investigations presented here. According to "Northern blot" analyses the RNAs of "true" BDV strains as well as the RNA of BVDV-like strain R2727 represent molecules of about 12.5 kb. Immunoprecipitation analyses of cells infected with the "true" BDV strain X818 led to identification of N^{pro}, C, E0, E1, E2, p125, p10, p30 and the C-terminal cleavage product of the putative RNA polymerase. The size of the RNA, the comparative sequence analysis and the analysis of BDV-encoded proteins suggest that the genome organization of BDV is similar to that proposed for BVDV and CSFV.

On the basis of these investigations both groups of ovine pestiviruses can now be differentiated. The data presented here will be important from the viewpoint of diagnosis, epidemiology and vaccine development.