

6. Zusammenfassung

Der Einfluß der Infektion mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe auf die Wirtszelle

Das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVD-Virus) ist ein Pestivirus der Familie *Flaviviridae* und das kausale Agens der *Mucosal Disease*. Aufgrund des Verhaltens in permissiven Rinderzellkulturen unterscheidet man zwei Biotypen. Während bei Zellen, die mit dem nichtzytopathogenen (nzp) Biotyp infiziert sind, keine morphologischen Veränderungen sichtbar sind, induziert der zytopathogene (zp) Biotyp in Abhängigkeit von Infektionsdosis und Zeit einen ausgeprägten zytopathischen Effekt (ZPE). Der ZPE ist gekennzeichnet durch zytoplasmatische Vakuolen, Kernpyknose und eine deutlichen Schrumpfung der betroffenen Zelle. Diese löst sich schließlich aus dem Zellverband und stirbt. Auch *in vivo* ist das Verhalten der beiden Biotypen unterschiedlich. Aus persistierend infizierten Tieren wird nur nzp BVD-Virus isoliert, während bei an MD erkrankten Rindern neben dem nzp zusätzlich noch zp BVD-Virus auftritt. Dabei ist der zp Biotyp, im Gegensatz zum nzp BVD-Virus, nur in bestimmten Organen und Zellen lokalisiert und stets mit Läsionen assoziiert. Die Ursache für die Zerstörung der Wirtszelle durch das zp BVD-Virus *in vivo* und *in vitro* ist unklar.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des nzp und des zp BVD-Virus auf die Wirtszelle *in vitro* untersucht. Dazu wurden Proliferationstests mit infizierten Zellen durchgeführt. Die beim ZPE auftretenden morphologischen Veränderungen wurden in primären wie permanenten Zellen in Abhängigkeit zur Zeit nachgewiesen. Dazu wurden die verschiedenen Zellorganellen mittels selektiver Fluoreszenzfarbstoffe dargestellt und auf Veränderungen untersucht. Alle Experimente wurden als Vergleichsstudien mit Zellen, die mit nzp BVD-Virus infiziert waren, durchgeführt. Als Kontrollen dienten nicht-infizierte Zellen. Zusätzlich wurde die subzelluläre Lokalisation dreier viraler Proteine bestimmt.

Die Proliferationstests mit Zellen, die mit dem BVD-Virus infiziert waren, zeigten, daß sich die Infektion mit zp BVD-Virus schon im frühen Infektionsstadium negativ auf das Zellwachstum auswirkte. Auch die Infektion mit dem nzp BVD-Virus hemmte die Proliferation der Wirtszelle, wenn auch wesentlich weniger als der zp Biotyp. Der hemmende

Einfluß der beiden Biotypen auf das Wachstum wird möglicherweise durch eine Runterregulation der zellulären Proteinbiosynthese verursacht.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß bei Zellen, die mit zp BVD-Virus infiziert waren, Apoptose induziert wurde und dazu eine Zusammenspiel mit dem nzp Biotyp zumindest *in vitro* nicht nötig war. Zelltod durch Nekrose wurde ausgeschlossen. Die Vorgänge in der apoptotischen Zelle differierten dabei zwischen den beiden untersuchten Zelltypen. Während bei den primären fetalen Kälbernierenzellen eine Ansäuerung der intrazellulären Matrix beobachtet werden konnte, lief die Apoptose in den permanenten MDBK-Zellen im neutralen pH-Bereich ab. Dies könnte auf eine Nutzung verschiedener Endonukleasen in den untersuchten Zellen bei der Apoptose hindeuten.

Die Lokalisation dreier viraler Proteine, den zwei Strukturproteinen E^{ns} und E2 sowie dem Nichtstrukturprotein NS2-3, zeigte nach subzellulärer Fraktionierung und Radioimmunpräzipitation keine Unterschiede zwischen den beiden Biotypen. Die drei Proteine waren in den mit nzp bzw. zp BVD-virusinfizierten Zellen fast vollständig in den Membranfraktionen lokalisiert. Auch das NS3, welches nur in Zellen, die mit zp BVD-Virus infiziert sind, exprimiert wurde, scheint nahezu ausschließlich membrangebunden zu sein. Es konnte erstmals die direkte Membranassoziation der Strukturproteine E^{ns} und E2 sowie der Nichtstrukturproteine NS2-3 bzw. NS3 beim zp Biotyp gezeigt werden. Dieses läßt Rückschlüsse auf die Freisetzung des BVD-Virus durch *budding* in die Zisternen des Endoplasmatischen Retikulums zu.

Summary

Beatrice Grummer

The influence of infection with bovine viral diarrhoea virus (BVD virus) on the cell

The bovine viral diarrhoea virus is a pestivirus within the family *flaviviridae* and the causative agent of fatal Mucosal Disease (MD). Due to their action in permissive bovine cell cultures two different virus biotypes can be distinguished. Cells infected with the noncytopathic (ncp) biotype do not seem to induce morphological changes. In contrast, cytopathic (cp) biotype viruses have a cytopathic effect (CPE) on permissive bovine cells which is proportional to incubation time and initial infectious dose. Affected cells develop cytoplasmic vacuoles, nuclear pyknosis and cell shrinking. Then they loose their cell-to-cell contacts and die. Differences between the effects of the two biotype viruses can also be found *in vivo*. Only ncp BVD virus can be isolated from persistently infected animals, while both biotype viruses can be isolated from cattle suffering from MD. In persistently infected animals, the ncp BVD virus can be detected in almost all organs. In contrast, in animals with MD the cp BVD virus is localized only in specific cells and organs and is found associated with the severe lesions mainly in the gastrointestinal tract.

In this study the specific effects of ncp and cp BVD biotype viruses on infected cells *in vitro* were analysed. For this, proliferation tests were performed and morphological changes after virus infection of primary and permanent cell cultures were monitored in accordance to time. Different cell organelles were visualized using selective fluorescent probes and examined for morphological changes. In addition, subcellular localisation of three viral proteins were determined.

Cellular proliferation after infection with BVD virus demonstrated an early influence on the growth rate of the infected cell. Both ncp and cp BVD virus inhibited cell growth. The effect was more pronounced with cp BVD biotype virus. It is conceivable that the inhibitory effect of BVD virus on cell proliferation is due to a down-regulation of cellular protein synthesis.

In addition it was shown that cp BVD virus induced apoptosis in infected cells, without the need of an interaction with ncp BVD biotype virus *in vitro*. Cell death due to necrosis was

excluded. The apoptotic pathways seem to differ in the two types of cell cultures examined. In primary fetal bovine kidney cells the cytoplasm became acidic during apoptosis. The permanent MDBK cells had a neutral pH. This may be indicative for the use of two different endonucleases during apoptosis.

Using subcellular fractionation and radio-immuno precipitation, it was shown that the three proteins analyzed – namely the envelope glycoproteins E¹²³ and E2, and the nonstructural protein NS2-3 – were almost quantitatively localized in the membrane fraction. Interestingly, the NS3 protein, which is only expressed in cells infected with cp BVD biotype virus, was also membrane bound. These results can be indicative for a release of BVD virus by budding into the cisterna of endoplasmic reticulum.