

Das Virus der Buchstabenseuche unter der Lupe

Robert Wyler, Monika Engels, Alfred E. Metzler, Universität Zürich

Die infektiöse bovine Rhinotracheitis (Akronym IBR, deshalb von den Tierbesitzern Buchstabenseuche genannt) und die infektiöse pustulöse Vulvovaginitis (IPV) beim Rind sind durch das bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) verursachte Krankheiten.

Es wird auf die Struktur des BHV-1 Genoms näher eingegangen, und es wird gezeigt, dass mit Hilfe der Restriktionsanalyse und der Kartierung der Restriktionsenzymchnittstellen eine Unterteilung der BHV-1 Stämme in drei Typen möglich war. Der Typ 3 wurde bei Kälbern isoliert, die in Argentinien an neurologischen Symptomen erkrankten. Mittels Kreuzhybridisation liess sich eine enge Verwandtschaft zwischen den Typen feststellen. Es ist deshalb anzunehmen, dass die Genomunterschiede zwischen den 3 Typen nur kleine Bereiche betreffen. Weiter wird auf die Identifikation von immunogenen Bestandteilen von BHV-1 eingegangen. Dabei bediente man sich der Immunofluoreszenz-Technik, der radioaktiven Markierung von Virusproteinen und deren Auftrennung in Acrylamidgelen. Unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern konnte gezeigt werden, dass zwei Komplexe von glykosylierten Virusproteinen gemeinsam für die Ausbildung der humoralen Immunität verantwortlich sind, indem diese virusneutralisierende und zytotoxische Antikörper induzieren.

Bovine infectious rhinotracheitis virus

Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) is the causative virus of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) and of infectious pustular vulvovaginitis (IPV).

In the present paper it is shown that by means of restriction patterns and mapping of restriction sites of the DNA, BHV-1 strains can be grouped into three types. Type 3 was isolated from tissues of calves with nonpurulent meningo-encephalitis. Cross-hybridization revealed a close antigenic relationship between the three types. It may therefore be assumed that the three types are differentiated from each other only by short regions of the genomes.

Additionally the immunogenic components of BHV-1 are dealt with. By means of radioactive labelling of viral proteins during replication in cells with subsequent separation of proteins using electrophoresis in polyacrylamide slab gels and by means of monoclonal antibodies it could be demonstrated that two complexes of glycosylated viral proteins jointly were responsible for a humoral immune response by inducing neutralizing and cytotoxic antibodies.

1 Einleitung

Mit der Redewendung «unter die Lupe nehmen» deutet man an, dass etwas genauer untersucht werden soll. Dies haben wir mit dem Virus der «Buchstabenseuche» vor.

Eigentlich stimmt der Titel in wissenschaftlicher Hinsicht nicht; denn Viren sind als bekanntlich zu den kleinsten Infektionserregern gehörende, biologische Partikel nur mit dem Elektronenmikroskop darzustellen. Die in etwa 20 Familien einteilbaren Viren bei Mensch und Tier (in der Folge animale Viren genannt) weisen nur einen Durchmesser von 20 nm (ein Millionstel mm) bis ca. 200 nm auf. Trotz der Kleinheit der Viruspartikel besteht ein grosser Formenreichtum. Hauptbestandteil der Viren bilden Proteine, miteingeschlossen

sen Glykoproteine und Lipoproteine. Ausserdem finden sich in den Viren Nucleinsäuren als das eigentlich infektiöse Prinzip, und zwar handelt es sich entweder um Ribonucleinsäure (RNA) oder Desoxyribonucleinsäure (DNA), nie aber enthält ein Viruspartikel beide Nucleinsäurearten, wie das in der Zelle der Fall ist. Die Nucleinsäure als Genom ist wie bei der Zelle in eine Art Kerngehäuse eingelagert, dies zu ihrer Stabilisierung und zum Schutz gegen äussere Einflüsse. Um dieses kernähnliche Gebilde ist bei Viren mit kubischer Struktur ein ikosaederförmiger Proteinmantel (Kapsid genannt) gelegt, der bei den später noch zu besprechenden Herpesviren zusätzlich von einer Hülle umgeben ist. Bei den Viren mit helikaler Struktur dagegen ordnen sich die Protomeren als Struktureinheiten schraubenförmig um die RNA, welche letztere dann in die Röhrenwand eingebettet wird. Animale Viren mit helikaler Struktur sind in der Regel mit einer Hülle versehen.

Viren bestehen, wie schon erwähnt, hauptsächlich aus Protein (Eiweiss) mit einem kleineren Anteil von Glyko- und Lipoproteinen sowie einer Nucleinsäure. Das Protein dient als Tarnkappe für die Nucleinsäure und erleichtert deren Eintritt in die Zelle, denn Viren sind als biologische Teilchen ohne Stoffwechsel ausgeprägte Parasiten und für ihre Vermehrung auf lebende Zellen angewiesen. Die Vermehrung erfolgt nicht durch Teilung wie bei Zellen, sondern in einem Replikationszyklus, der verschiedene Schritte umfasst. In Bild 1 ist der Replikationszyklus am Beispiel eines Herpesvirus, zu denen auch das Virus der Buchstabenseuche gehört, schematisch dargestellt.

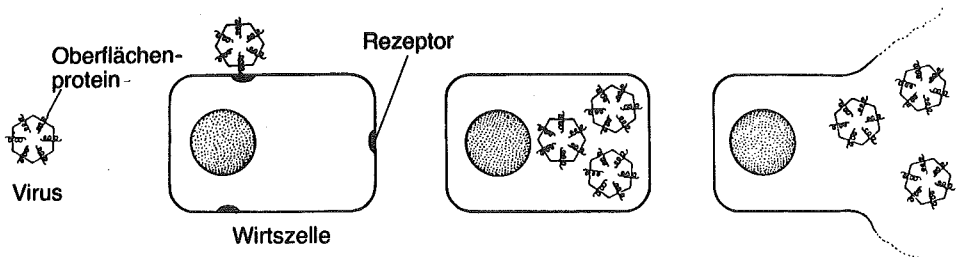


Bild 1 Stark schematisierter viraler Replikationszyklus mit den folgenden Phasen: Adsorption, Penetration, Biosynthese und Freisetzung.

Fig. 1 Schematic depiction of the viral replication cycle with the following steps: Adsorption, penetration, biosynthesis and egress of virus from the infected cell.

Bei der Vermehrung eines Virus in der Zelle sind je nach Virusart vier Ausgänge möglich:

1. Zerstörung der Zelle (auch zytopathischer Effekt genannt).
2. Funktionsstörung der Zelle.
3. Umwandlung einer normalen Zelle in eine Krebszelle (Transformation) nach Infektion mit einem Tumovirus.
4. Die Virusreplikation in der Zelle läuft ohne Schädigung und Störung ab.

Viren können ausser bei Mensch und Tier auch bei Pflanzen und Bakterien Krankheiten und Infektionen verursachen.

Nach dieser Einleitung sei auf das Virus der Buchstabenseuche und die Art der Infektion näher eingegangen. Die infektiöse *bovine Rhinotracheitis* (IBR = ansteckende Nasenluftröhrenentzündung) und die infektiöse *pustulöse Vulvovaginitis* (IPV = ansteckende Scheidenentzündung bei Kühen und Vorhautentzündung bei Stieren) werden durch das Rinderherpesvirus vom Typ 1 (BHV-1) verursacht. Weil sich die Tierbesitzer unter den Akronymen nichts vorstellen konnten, wurde die Infektion Buchstabenseuche genannt.

Beim BHV-1 handelt es sich um ein grosses Virus, das Kapsid misst 100 nm im Durchmesser, und zudem ist das Viruspartikel umgeben von einer Hülle, was einen Totaldurchmesser von 150 nm ergibt (Bild 2). Das Kapsid besteht aus 162 Kapsomeren, die eine sechseckige Röhrenstruktur zeigen. Man muss mit etwa 40 Proteinen rechnen, die am Aufbau des Viruspartikels beteiligt sind. Das Kapsid bildet einen Innenkörper (Gehäuse), in dem die doppelsträngige DNA (Desoxyribonukleinsäure) als infektiöses Prinzip des Viruspartikels um eine fibrilläre Spindel gewunden ist, wobei die Anordnung der Spindel nicht genau bekannt ist. Die DNA macht 6,5% des Viruspartikels aus und weist ein Molekulargewicht von etwa 90 Mio auf. Auf die Struktur der DNA wird später noch zurückzukommen sein.

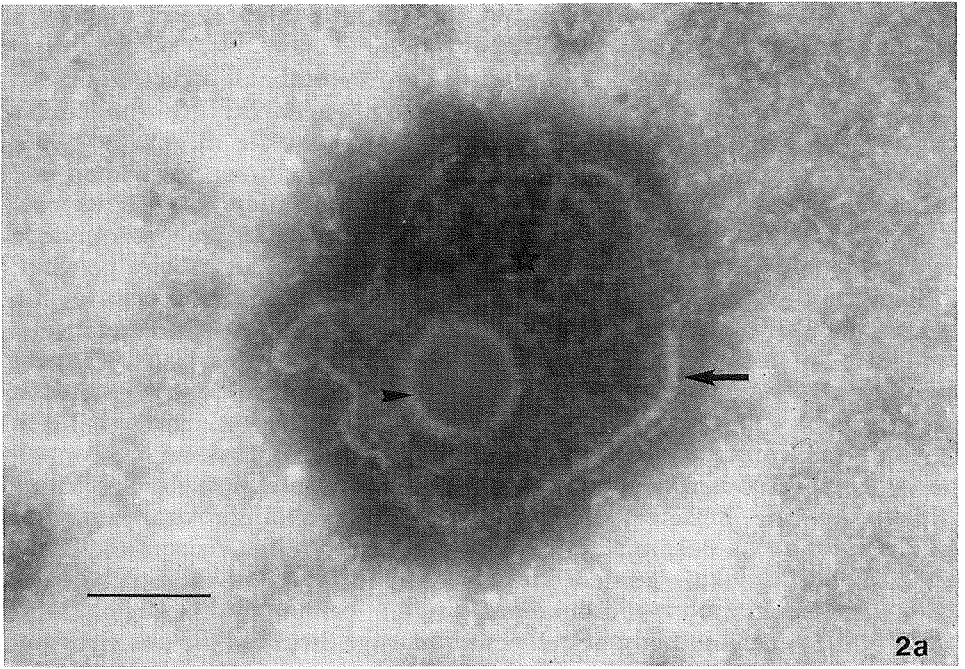
Die Hülle zeigt eine typische zellmembranartige Struktur, die aus viruspezifisch veränderten Abschnitten der Zellmembran besteht. An der Oberfläche der Hülle finden sich stachelige Fortsätze. Zwischen Hülle und Kapsid kann elektronenoptisch das Tegument als schwer darstellbares, fibröses Gebilde ausgemacht werden, dessen eigentliche Struktur aber nicht abgeklärt ist, ebenso wenig wie dessen biologische Funktion.

Die Familie der Herpesviridae lässt sich aufgrund verschiedener Kriterien in 3 Subfamilien einteilen:

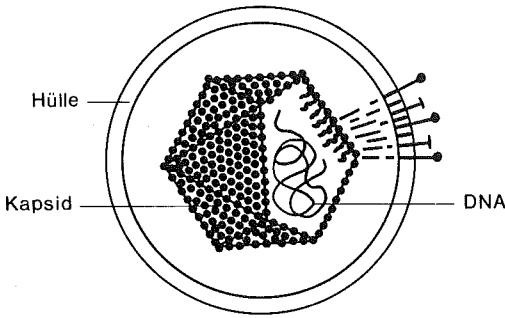
Erstens in die schnell sich vermehrenden Alphaherpesvirinae. Zweitens in die grosse Zellen induzierenden Betaherpesvirinae (Zytomegalieviren) und drittens in die Lymphozyten befallenden Gammaherpesvirinae, von denen einzelne Vertreter onkogen sein, also Tumoren erzeugen, können.

Das IBR-Virus gehört zu den Alphaherpesvirinae. Es führt nach Infektion zu einer Zellzerstörung. Berichte, wonach es auch onkogene Eigenschaften besitzt, sind bisher nicht bestätigt worden.

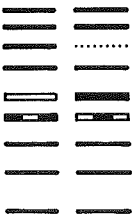
Herpesviren weisen eine Eigenschaft auf, die sie von andern Viren unterscheidet (Bild 3). Nach einer Primärinfektion geht diese in eine latente Form über, und zwar zieht sich das Virus auf der Nervenschiene (Axon) in das Zentralnervensystem zurück. Nach einer Infektion der Atemwege findet sich IBR-Virus DNA in Neuronen der Trigeminalganglien und nach einer Infektion des Genitaltrakts in Neuronen der Sakral-(Lenden-)Ganglien. In der latenten Phase lässt sich in diesem Gewebe keine aktive Virusreplikation feststellen, sondern man kann nur die Nukleinsäure (DNA) im Kern von Ganglienzellen, aber keine Viruspartikel und keine Virusproteine nachweisen.



VIRUSMODELL



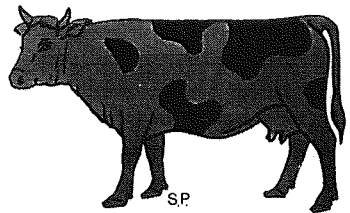
PROTEINE



NUKLEINSÄURE



WIRSTIER



Weg des IBR-Virus während der Primärinfektion (A), der Latenz (B) und der Wiederausscheidung (C).

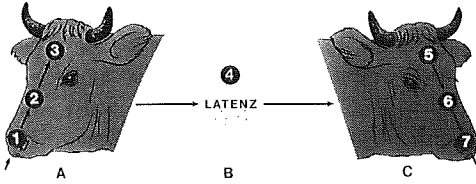


Bild 3 Schematische Darstellung der primären Infektion, der Latenz und Reaktivierung nach einer bovinen Herpesvirus Typ 1-Infektion.

Fig. 3 Schematic representation of the primary infection, the latent state and the reactivation after a bovine herpesvirus type 1 infection.

Bei Stress-Situationen wie Transport, Geburt oder nach Applikation von Kortikosteroiden (Nebennierenhormonen) wird das Infektionsgeschehen reaktiviert, in den Ganglienzellen kommt es zur Bildung von Viren, die via Nervenbahn auf demselben Weg zurück auf die Schleimhäute, wo sie herkommen, gelangen, sich dort vermehren und wieder ausgeschieden werden. In der latenten Phase der Infektion weist das Tier Antikörper im Serum auf, die jahrelang persistieren können. Deshalb werden serologisch positive Tiere, welche Antikörper gegen das IBR-Virus im Blut aufweisen, aber nicht krank zu sein brauchen, ausgemerzt, weil jederzeit die Gefahr einer Virusausscheidung nach Reaktivierung der Infektion besteht.

Nun ein paar Worte zur Geschichte der Buchstabenseuche in der Schweiz. Die IPV ist in der Schweiz als Bläschenseuche seit langem bekannt. Die Übertragung erfolgte ausschliesslich durch den Deckakt. Der wirtschaftliche Schaden war bei dieser Infektion eigentlich nie bedeutend. Hingegen war der ökonomische Schaden, den die IBR bei ihrem Auftreten im Jahre 1978 besonders in der Ostschweiz verursachte, gravierend. Tiere gingen wegen der Respirationstrakterkrankung verloren, und infolge der gehäuften Aborte stieg der wirtschaftliche Verlust beträchtlich an. Neben den für IBR typischen Krankheitsbildern der oberen Luftwege mit hohem Fieber und Konjunktivitis, die nach einer Sekundärinfektion mit Bakterien in eine Pneumonie auslaufen kann, sowie der Affektion des Genitaltrakts bei der IPV, die als harmloses, aber schmerzhaftes Koitalexanthem bei männlichen und weiblichen Tieren verläuft, sind auch andere klinische Bilder nach Infektion mit dem IBR-Virus beschrieben wie Enzephalitis bei Kälbern, Verwerfen, Metritis, Enteritis, Mastitis oder Oophoritis, um nur einige zu nennen.

◀ Bild 2a Elektronenoptisches Bild des bovinen Herpesvirus Typ 1. Im Zentrum das Kapsid (Ø 100 nm) (►) mit den sechseckigen, röhrenförmigen Kapsomeren. Daran anschliessend das Tegument (☆) und die zellmembranähnliche Hülle mit den stacheligen Fortsätzen (←). Der Balken entspricht 100 nm.

Bild 2b Schematische Darstellung eines Herpesvirus, eines elektrophoretischen Proteinmusters, der Virusnukleinsäure (DNA) und des Wirtstieres.

Fig. 2a Electronmicroscopical picture of a bovine herpesvirus type 1 with the capsid in the center. The capsomeres display a tubular-hexagonal structure. The capsid is surrounded by the tegument and the envelope with spike-like projections. The bar represents 100 nm.

Fig. 2b Schematic diagram illustrating the structure of a herpesvirus, electrophoretic protein patterns, the nucleic acid (DNA), and the host.

Aufgrund der damaligen wirtschaftlichen Bedeutung der Krankheit und der niedrigen Durchseuchungsrate wurde beschlossen, die IBR/IPV-Virusinfektion von Staates wegen zu bekämpfen, indem man kranke und serologisch positive Tiere, die aufgrund ihres Gehaltes an Antikörpern im Serum die Infektion durchgemacht hatten, ausmerzte. Die Bekämpfung einer bovinen Herpesvirusinfektion in unserm Land war als ein Weltnovum, wegen der latenten Form nicht unumstritten. Andere Länder konnten sich ein solches Verfahren wegen der hohen Durchseuchungsrate in der Rinderpopulation gar nicht leisten. Wie jedoch die Erfahrung zeigt, ist die Ausmerzaktion von Erfolg gekrönt.

Im Kanton Zürich z.B. waren schon 1984 88% der insgesamt 4500 Bestände frei von IBR und IPV. 1985 zählte man nur noch 23 wegen IBR-Infektion gesperrte Bestände, während es zu Beginn der Ausmerzkampagne noch über 600 Betriebe waren.

Bisher nahm man an, dass es sich bei beiden Manifestationen, der IBR und der IPV, um ein identisches Virus handle. Es liessen sich jedoch gewisse biologische Eigenschaften der Virusstämme beobachten, welche analog wie beim *Herpes simplex* Virus eine Differenzierungsmöglichkeit in zwei Typen andeuten:

An erster Stelle ist die Organlokalisation zu nennen. Für IBR ist es der Respirationstrakt, für IPV der Genitaltrakt. Dabei ist zu bemerken, dass auch Ausnahmen von der Regel vorkommen.

Zweitens treten gewisse Virulenzfaktoren bei IBR deutlicher in Erscheinung. Nur bei IBR und nicht bei IPV wird Abort beobachtet, und nach IBR-Infektionen ist der Antikörpertiter in der Regel höher als nach IPV-Infektionen; auch die Temperatur steigt rascher und höher an als bei IPV.

Drittens besteht ein Unterschied in der Empfindlichkeit gegenüber dem Herpesvirus-Hemmstoff Phosphonoformiat, einem Hemmer der Virus-DNA-Polymerase.

Eine Unterscheidung anhand von einfachen serologischen Methoden, wie dem Serumneutralisationstest, war aber bisher nicht möglich.

Da Virusstämme aus der Gruppe der IBR/IPV-Viren offensichtlich verschiedene Organe bevorzugen und auch unterschiedlich virulent sind, stellten wir uns die Frage, ob diese Eigenschaften nicht genetisch verankert sind; denn unser Wissen über Virulenzmechanismen ist fragmentarisch, das Problem als solches ist aber sowohl von wissenschaftlichem wie praktischem Interesse. Daneben nahmen wir uns auch vor, verschiedene IBR/IPV-Virusstämme zu charakterisieren und zu typisieren.

Um diese Frage genau zu klären, benötigen wir Daten über die Eigenschaften von IBR/IPV-Viren, die uns als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen. Im folgenden soll über die Ergebnisse der grundlegenden Experimente berichtet werden. Dabei hat Frau Engels sich des Genoms, also der DNA, angenommen, während Herr Metzler die Proteine bearbeitete.

2 Untersuchung des Genoms von IBR/IPV-Viren

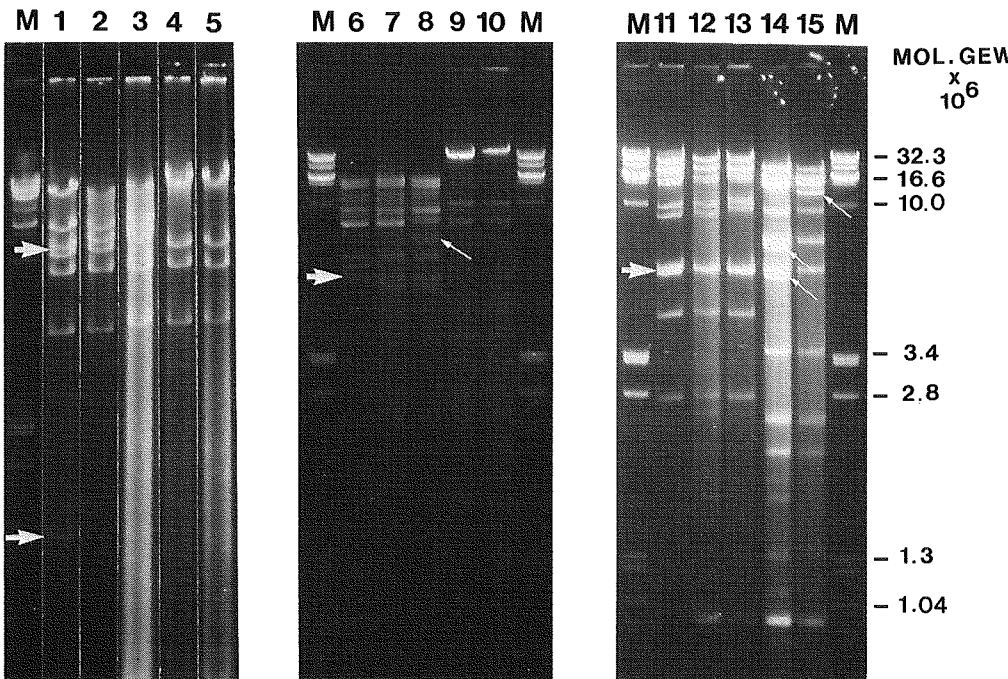
Die genetischen Eigenschaften der IBR/IPV-Viren sind wie bei den Zellen in einem chemisch definierten Molekül, der Desoxyribonukleinsäure (engl. DNA), verankert. Die DNA ist ein aus Desoxyribonukleotiden aufgebautes Biopolymer in Form einer Doppelhelix. Das DNA-Molekül besteht aus zwei komplementären, aber nicht identischen Polynukleotideinzelsträngen, die um eine hypothetische Achse eine Spirale bilden. Die beiden Spiralbänder bestehen aus Zucker-Phosphatketten, von denen aus Basen senkrecht zur Achse in das Innere der Doppelhelix hineinragen. Es handelt sich dabei um die komplementären Basen Adenin (A) und Thymin (T) beziehungsweise Cytosin (C) und Guanin (G), die durch Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Die Reihenfolge der Basen im Molekülstrang bildet die Grundlage der Erbinformation, denn je drei aufeinanderfolgende Basen bilden die Ablesematrix für eine Aminosäure im Prozess der Proteinsynthese. Genetisch identische Viren weisen eine identische Reihenfolge der Basen in ihrer DNA auf.

2.1 Restriktionsanalyse

Die Identität der Basensequenz verschiedener Virusstämme wird mittels Restriktionsanalyse geprüft, wobei man es mit einem groben Raster zu tun hat. Seit einigen Jahren kennt man bakterielle Enzyme, die die Eigenschaft haben, eine DNA an ganz bestimmten Stellen entzweizuschneiden. Jedes dieser Restriktionsenzyme hat eine eigene charakteristische Erkennungssequenz. Darunter versteht man eine Gruppe von meistens 6 Basen, die in einer definierten Reihenfolge vorliegen müssen. Als Beispiel sei hier das Enzym HindIII erwähnt. Es wurde aus dem Bakterium *Hämophilus influenzae* Rd isoliert und schneidet die DNA überall da, wo die Sequenz A - A - G - C - T - T vorliegt, und zwar zwischen den beiden A. Die Behandlung einer DNA mit einem Restriktionsenzym hat zur Folge, dass das fadenförmige Molekül je nach Anzahl spezifischer Erkennungssequenzen in verschieden viele und verschieden grosse Fragmente geschnitten wird. Die einzelnen Fragmente lassen sich in Agarosegelen elektrophoretisch auftrennen, das heisst, unter Stromfluss wandern die Fragmente im Gel je nach ihrer Grösse mit unterschiedlicher Geschwindigkeit – die grossen langsam, die kleinen schnell. Nach der Auftrennung werden die DNA-Fragmente im Gel mit einem fluoreszierenden Farbstoff (Ethidiumbromid) gefärbt und unter UV-Bestrahlung photographiert. Das Resultat ist ein sogenanntes Restriktionsmuster, in dem die Fragmente nach Molekulargewicht und Zahl beurteilt werden können. Identische Restriktionsmuster zweier DNAs bedeuten Identität der Virusstämme.

2.2 Restriktionsanalyse von IBR/IPV-Virusstämmen

Mittels Restriktionsanalyse haben wir die DNAs von IBR/IPV-Virusstämmen verschiedenster Herkunft miteinander verglichen. Es handelt sich um europäische, nordamerikanische und argentinische Virusstämme, und um ein australisches Isolat, die im Zusammenhang mit allen für IBR/IPV-Viren bekannten Krankheitserscheinungen isoliert wurden. Die Isolate aus Argentinien und das eine australische Isolat stammten von Kälbern, die an Enzephalitis erkrankt waren. Die Untersuchungen führten zu folgendem Ergebnis: Der Grossteil der untersuchten Virus-DNAs konnte in 2 Typen eingeteilt werden, deren Restriktionsmuster zwar sehr ähnlich, aber dennoch durch Unterschiede in Form veränderter Fragmentgrößen und zusätzlicher bzw. fehlender Fragmente gekennzeichnet waren. Die DNAs des 2. Typs konnten ausserdem in 2 Subtypen unterteilt werden. Beide Typen waren vertreten bei IBR- und IPV-Isolaten, wobei Typ 1 mehrheitlich bei IBR- und Abort-, Typ 2 mehrheitlich bei IPV-Isolaten zu finden war. Überraschenderweise zeigten die DNAs der Enzephalitisisolate aus Argentinien und Australien durchwegs ein völlig anderes Restriktionsmuster und setzten sich damit als Typ 3 eindeutig von den anderen beiden Typen ab. Auch dieser Typ konnte in 2 Subtypen unterteilt werden. In Bild 4 sind die EcoRI-, HindIII- und BstEII-Muster der 3 Typen mit ihren Subtypen durch je einen Vertreter vorgestellt.



2.3 Kartierung der Restriktionsenzym-Schnittstellen

Nachdem mittels Restriktionsanalysen eine Typisierung der IBR/IPV-Isolate vorgenommen werden konnte, interessierte uns die Lokalisation der festgestellten Unterschiede im Genom. Zu diesem Zweck war die Lage der jeweiligen Schnittstellen, die zur Bildung der Fragmente führten, zu bestimmen. Diesen Vorgang nennt man Kartierung, und das Vorgehen ist das folgende: Einzelfragmente, die durch Schneiden der DNA mit einem 1. Enzym entstanden sind, werden aus dem Agarosegel extrahiert und mit einem 2. Enzym geschnitten. Dasselbe geschieht mit den Einzelfragmenten des 2. Enzyms, die mit dem 1. Enzym geschnitten werden. Dadurch entstehen einander zuzuordnende Spaltprodukte, indem man als Vergleichsbasis die mit beiden Enzymen gleichzeitig geschnittene komplette DNA beizieht. Für Detailabklärungen stehen weitere Methoden zur Verfügung, auf die hier nicht eingegangen werden soll. Mit den ermittelten Schnittstellenkarten liessen sich die durch Restriktionsanalyse festgelegten Typen- und Subtypenunterschiede bestätigen und zugleich lokalisieren. Wie die Restriktionsmuster vermuten liessen, waren die Unterschiede zwischen den DNAs der Typen 1 und 2 sowie der Subtypen 2a und 2b nur sehr gering und äusserten sich hauptsächlich in Form von Grössenunterschieden einzelner Fragmente bei gleichbleibender Lokalisation der Schnittstellen. Unterschiede zwischen Typ 1 und 2 in Form von fehlenden oder zusätzlichen Schnittstellen beschränkten sich auf zwei Regionen des Genoms, die innerhalb der Karteneinheiten 0.18 – 0.22 und 0.83 – 0.92 (Bild 5) liegen. Dadurch konnten teilweise auch Grössenveränderungen einzelner Fragmente erklärt werden.

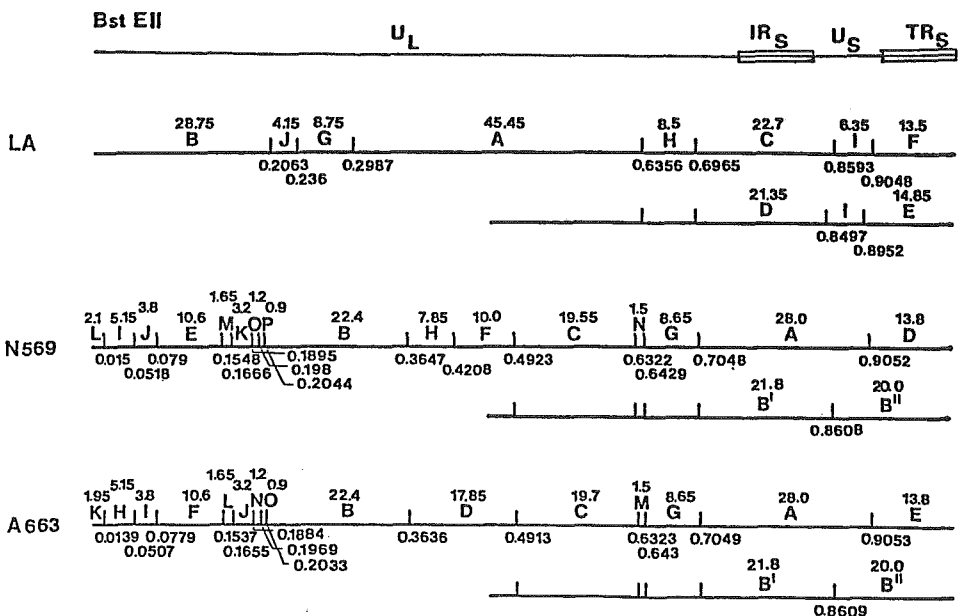
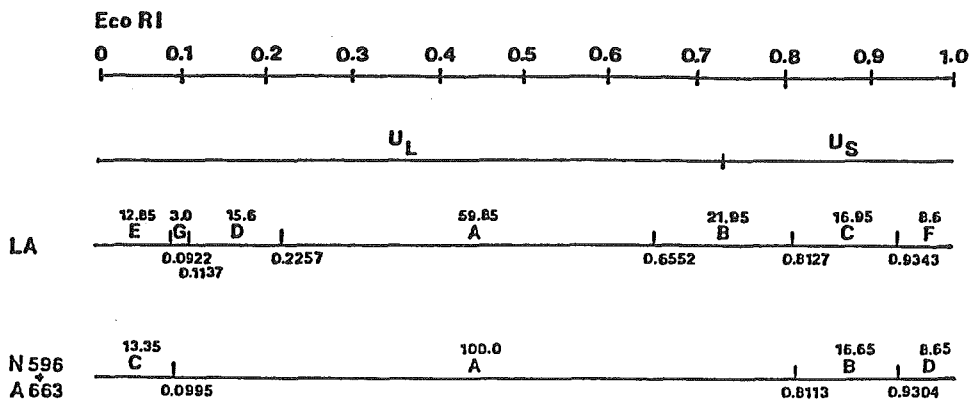
◀ Bild 4 Restriktionsanalyse von IBR/IPV-Virus DNAs

Die Abbildung zeigt die DNAs der drei Virustypen mit ihren Subtypen, verdaut mit EcoRI (Bahnen 1–5), HindIII (Bahnen 6–10) und BstEII (Bahnen 11–15). Die Restriktionsmuster von Typ 1 (vertreten durch den amerikanischen Referenzstamm «LA») sind in den Bahnen 1, 6 und 11 gezeigt, diejenigen von Subtyp 2a (europäisches Feldisolat «Spiel») in den Bahnen 2, 7 und 12, Subtyp 2b (amerikanischer Referenzstamm «K22») in den Bahnen 3, 8 und 13, Subtyp 3a (australischer Referenzstamm «N569») in den Bahnen 4, 9 und 14 und von Subtyp 3b (argentinisches Feldisolat «A663») in den Bahnen 5, 10 und 15. M = Lambda DNA als Molekulargewichtsmarker. Die grossen Pfeile weisen auf Hauptunterschiede zwischen Typ 1 und 2, die kleinen Pfeile auf Subtypenunterschiede. Die Fragmente werden von oben nach unten aufgrund ihres Molekulargewichts in alphabetischer Reihenfolge bezeichnet.

Fig. 4 Restriction enzyme analysis of IBR/IPV-virus DNAs

Fig. 4 demonstrates the three virustypes with subtypes, digested with EcoRI (lane 1–5), HindIII (lanes 6–10) and BstEII (lanes 11–15). The restriction patterns of type 1 (represented by the american reference strain «LA») are shown in lanes 1, 6 and 11, those of subtype 2a (european field isolate «Spiel») in lanes 2, 7 and 12, of subtype 2b (american reference strain «K22») in lanes 3, 8 and 13, of subtype 3a (australian reference strain «N569») in lanes 4, 9 and 14 and of subtype 3b (argentinian field isolate «A663») in lanes 5, 10 and 15. M = Lambda DNA used as a molecular weight marker. Large arrowheads indicate main differences between types 1 and 2, small arrows indicate subtype differences. Fragments are designated in alphabetical order, beginning with the largest one.

Abweichend erwiesen sich die Schnittstellenkarten von Typ 3 DNA, von denen als Beispiel die EcoRI- und BstEII-Karten der Stämme N569 und A663 im Vergleich mit denjenigen einer Typ 1 DNA (Stamm LA) in den Bildern 5 und 6 dargestellt sind. Vergleicht man die EcoRI-Karten (Bild 5), gelangt man zur Feststellung, dass auf dem Typ 3 Genom drei Schnittstellen im Innern des Moleküls verlorengegangen sind, aber dass die Molekülenden bei beiden Typen übereinstimmen. Beim Vergleich der BstEII-Karten (Bild 6) jedoch lässt sich keine Übereinstimmung mehr finden. Zudem ist ersichtlich, dass sich Subtyp 3b (Stamm A663) durch eine fehlende BstEII-Schnittstelle (Fragment D) von Subtyp 3a (Stamm N569) unterscheidet.



2.4 Kreuzhybridisierung

Der Verwandtschaftsgrad zwischen IBR/IPV-Viren des Typs 1 und 2 erwies sich aufgrund der Restriktionsanalyse und der Schnittstellenkarten als unbestritten gross. Die deutliche Abweichung des Typs 3 liess jedoch Zweifel aufkommen, ob diese – serologisch als IBR/IPV-Viren identifizierten – Virusstämme als solche anzusprechen sind. Deshalb hybridisierten wir radioaktiv markierte einzelsträngige DNA-Fragmente der Typen 1 und 2 auf nicht markierte einzelsträngige DNA-Fragmente des Typs 3 und umgekehrt. Eine Verbindung der beiden DNA-Spezies aufgrund komplementärer Basen wurde mittels Autoradiographie (Röntgenfilm) nachgewiesen. Wir fanden eine komplette Hybridisation zwischen den DNAs der drei Typen und konnten damit Typ 3 als IBR/IPV-Virus identifizieren. Da die Restriktionsanalyse und die Schnittstellenkarten bewiesen, dass die Basensequenz der drei Typen, insbesondere des Typs 3, nicht identisch sind, lassen die Hybridisierungsversuche vermuten, dass die Veränderungen nur in kleinen Bereichen zu suchen sind. Das heisst, es könnten Punktmutationen, also ein Austausch von einer einzigen Base, dazu geführt haben, dass ein Restriktionsenzym seine Erkennungssequenz nicht mehr vorfindet. Es könnte aber auch eine Sequenz mehrerer Basen verändert sein, die bei der Hybridisation durch Bindung zwischen den noch vorhandenen komplementären Basen überbrückt worden wäre. Die Frage lässt sich nur durch Basensequenzanalysen der betreffenden DNA-Anschnitte beantworten. Mit diesen oben genannten Methoden lassen sich keine funktionellen Unterschiede zwischen den Virustypen, wie z.B. Organlokalisation oder Virulenz, auf dem Virus-Genom lokalisieren. Das nächste Ziel wird

◀ Bilder 5 und 6: Schnittstellenkarten der Restriktionsenzyme EcoRI und BstEII auf ausgewählten IBR/IPV-Virus DNAs

IBR/IPV-Virusstämme: <LA> ist als Typ 1, <N569> als Subtyp 3a und <A663> als Subtyp 3b Vertreter dargestellt. Die Zahlen über den Fragmenten geben die Grösse der Fragmente in Kilobasenpaaren an. Die Zahlen unter den Schnittstellen bezeichnen die «Karteneinheit» bezogen auf eine Unterteilung des Genoms in Einheiten von 0 bis 1.0 (s. erste Linie Bild 5). Genomstruktur (erste Linie Bild 6): das Genom der IBR/IPV-Viren ist zusammengesetzt aus einer langen (U_L) und einer kurzen (U_S) individuellen Sequenz, wobei U_S von 2 umgekehrt repetierten Sequenzen IR_S und TR_S (I = intern, T = terminal) flankiert ist. Da U_S mit den repetierten Sequenzen in zwei Orientierungen vorliegen kann, gibt es 2 verschiedene Karten des rechten Molekülandes, wenn Schnittstellen innerhalb U_S liegen. Typen- und Subtypenunterschiede sind im Text beschrieben.

Fig. 5 and 6: Restriction site maps of the enzymes EcoRI and BstEII on the genomes of selected IBR/IPV viruses

IBR/IPV virus strains: <LA> represents type 1, <N569> subtype 3a and <A663> subtype 3b DNAs, Numbers above each fragment are molecular weights in kilobase pairs. Numbers below the restriction sites indicate the «map units» concerning the subdivision of the genomes into units 0–1.0 (see first line Fig. 5). Genome structure (first line Fig. 6): the IBR/IPV virus genome consists of a long (U_L) and a short (U_S) unique sequence. U_S is flanked by inverted repeats IR_S and TR_S (I = internal, T = terminal). Since U_S with the repeats can be arranged in two orientations, there exist two different maps at the right hand end of the molecule, if restriction sites are situated within U_S . For type and subtype differences see text.

demnach sein, auf der Virus-DNA Genabschnitte, die für Proteine mit einer bestimmten Funktion kodieren, zu orten.

3 Identifikation von immunogenen Bestandteilen des IBR/IPV-Virus

Die meisten Infektionskrankheiten hinterlassen einen Zustand der Immunität, der dadurch gekennzeichnet ist, dass die betroffenen Individuen vor erneuter Krankheit mit demselben Erreger geschützt sind. Die Immunität ist u.a. mit dem Auftreten von Serumantikörpern, den sogenannten Immunglobulinen, assoziiert. Diese vermögen nicht nur das Virus zu neutralisieren; sie sind auch in der Lage, virusinfizierte Zellen spezifisch zu zerstören. Diese auch als humoral bezeichnete Immunität steht neben der zellulären Immunität, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll, im Zentrum der Infektabwehr. Es kann davon ausgegangen werden, dass die im Verlaufe der Infektion auftretenden Serumantikörper ihre Wirkung entfalten, indem sie mit Virusbestandteilen reagieren, die entweder auf der Virusoberfläche oder aber auf der Membran der infizierten Zelle exponiert sind. Wir stellten uns deshalb die Frage, wie das IBR/IPV-Virus aufgebaut ist und welche Virusbestandteile mit den neutralisierenden oder zytotoxischen Antikörpern reagieren. Die nachfolgend wiedergegebenen Resultate der Untersuchung eines Vertreters der IBR/IPV-Viren basieren im wesentlichen auf der Immunofluoreszenz-Technik, auf der radioaktiven Markierung der Virusproteine und deren Auftrennung in Acrylamidgelen sowie auf der Verwendung von monoklonalen Antikörpern.

Das erste Experiment sollte uns Aufschluss über die Zahl und Grösse der in den infizierten Zellen neu gebildeten Virusproteine geben. Zu diesem Zwecke infizierte man verschiedene Zellkulturen mit dem Virus (Bild 7) und markierte die neugebildeten Proteine in Intervallen bis zur 22. Stunde nach der Infektion mit der radioaktiven Aminosäure [³⁵S]Methionin. Nichtinfizierte Kulturen behandelte man zu Vergleichszwecken analog. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der markierten Proteine kann man erkennen, dass in den infizierten Zellen schon in den ersten zwei Stunden nach der Infektion ein mit «d» bezeichnetes Protein auftritt (Bahn 3), das in den Kontrollkulturen (Bahnen 1 und 2) nicht vorhanden ist. Im weiteren Verlauf der Infektion werden in zunehmender Zahl neue Virusproteine erkennbar. Diese sind in Bahn 8 bezeichnet. Mit Hilfe der angeführten gelelektrophoretischen Auftrennung von radioaktiv markierten Proteinen lassen sich in der infizierten Zellkultur mehr als 40 virusspezifische Proteine identifizieren, deren Molekulargewicht zwischen 17 000 und über 200 000 Daltons liegt. Die mit kleinen Buchstaben versehenen Proteine sind nicht Bestandteil des reifen Viruspartikels. Sie erfüllen bei der Virusreifung und Virusfreisetzung enzymatische Funktionen. Im Bild 7 fällt weiter auf, dass die Synthese praktisch aller Wirtszellproteine (z) innerhalb von 24 Stunden zum Erliegen kommt. Dies veranschaulicht die Tatsache, dass die infizierte Zelle im Verlauf der Infektion zu-

grunde geht. Zum anderen erleichtert dieses Phänomen die Identifikation der viralen Proteine.

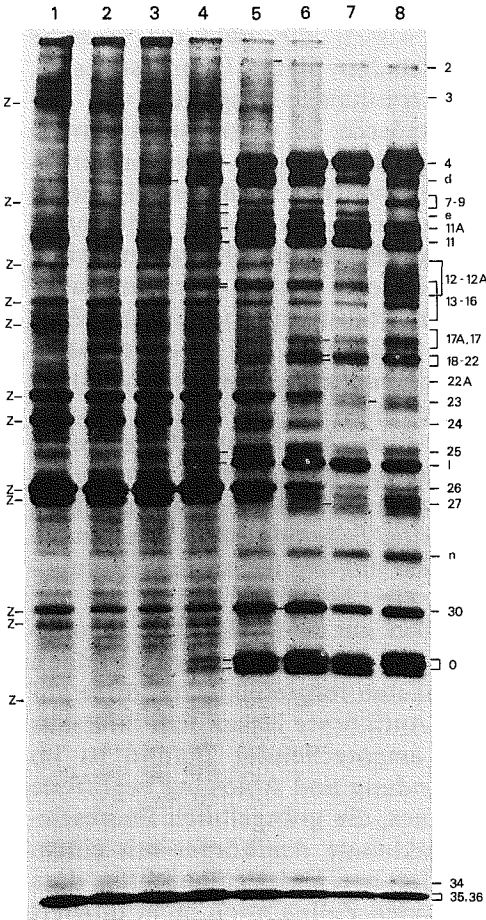


Bild 7 Proteinsynthese-Kinetik in mit BHV-1 (Bovines Herpesvirus 1) infizierten (Bahn 3 bis 8) und nicht-infizierten (Bahn 1, 2) MDBK-Zellen. Die radioaktive Markierung neugebildeter Proteine mit $[^{35}\text{S}]$ Methionin erfolgte in Intervallen (Stunden post infectionem: h.p.i.): 0 bis 2 h.p.i. (Bahn 2, 3), 2 bis 4 h.p.i. (Bahn 4), 4 bis 6 h.p.i. (Bahn 5), 6 bis 8 h.p.i. (Bahn 6), 8 bis 10 h.p.i. (Bahn 7), 10 bis 22 h.p.i. (Bahn 8, 1). Beachte die im Verlauf der Infektion neu auftretenden Virus-induzierten Proteine und die sukzessive Reduktion der Wirtszell-eigenen Proteinsynthese (z). Die Virus-induzierten Proteine sind in Bahn 8 gekennzeichnet.

Fig. 7 Protein synthesis kinetic in BHV-1 (bovine herpesvirus 1) infected MDBK cells. Infected (lane 3 to 8) and mock-infected (lane 1, 2) cultures were pulse-labeled with $[^{35}\text{S}]$ methionine at various times (hours post infection: h.p.i.): 0 to 2 h.p.i. (lane 2, 3), 2 to 4 h.p.i. (lane 4), 4 to 6 h.p.i. (lane 5), 6 to 8 h.p.i. (lane 6), 8 to 10 h.p.i. (lane 7), 10 to 22 h.p.i. (lane 8, 1). Note the appearance during infection of virus-induced proteins and the successively reduced synthesis of host cell proteins (z). Virus-induced proteins are indicated in lane 8.

Mit Immunsereen, die virusspezifische Antikörper enthalten, lassen sich alle Virusproteine als solche erkennen. Vergegenwärtigt man sich den räumlichen Aufbau der intakten Zelle und des reifen Viruspartikels, so erscheint es naheliegend, dass nur jene Antikörper eines Immunsereums zur Virusneutralisation beziehungsweise zur Zell-Lyse befähigt sind, die Zugang zu oberflächlich liegenden Virusbestandteilen haben.

Die in der Folge beschriebenen, mit monoklonalen Antikörpern durchgeführten Experimente sollten Aufschluss über die oberflächlich exponierten

Virusproteine geben. Die hervorragende Eigenschaft der monoklonalen Antikörper besteht darin, dass sie entsprechend ihrer Antigenspezifität nur an umschriebene Bezirke eines Proteins, die sogenannte Antigen determinante, zu binden und damit eine biologische Wirkung zu entfalten vermögen. Dabei weist ein gegebenes Protein verschiedene Antigen determinanten auf. Von den Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten wissen wir, dass die einzelne Zelle Immunglobuline mit identischen Eigenschaften bildet. Damit ist gesagt, dass Antikörper, die mit verschiedenen Determinanten reagieren, von verschiedenen B-Lymphozyten gebildet werden müssen. Im Organismus können sich B-Lymphozyten vermehren und einen Zellklon bilden. Die von einem Klon gebildeten Antikörper sind ihrerseits identisch, d.h. monoklonal. Die im Blut immuner Tiere zirkulierenden Antikörper sind naturgemäss polyklonal, d.h. sie reagieren immer mit einer Vielzahl von Proteinen. Die faszinierende Entdeckung, dass man Antikörper-produzierende B-Lymphozyten im Labor durch Fusion mit bestimmten Zell-Linien immortalisieren und einzelne Zellklone selektionieren kann, ist 1985 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet worden. Dieses Verfahren erlaubt die uneingeschränkte Produktion von hochspezifischen monoklonalen Antikörpern.

Wir haben in unserem Institut zahlreiche monoklonale Antikörper gegen IBR/IPV-Viren etabliert. Da wir uns vor allem für oberflächlich liegende Virusproteine interessieren, haben wir die einzelnen Antikörper dahingehend geprüft, ob sie mit der Oberfläche der infizierten Zelle oder dem intakten Viruspartikel reagieren. Diese Fragen liessen sich mit der indirekten Immunfluoreszenz-Technik und im Plaquesreduktionstest beantworten.

Inkubiert man lebende, virusinfizierte Zellen mit monoklonalen Antikörpern, können diese, wegen der Undurchlässigkeit der Zellmembran, nur dann mit der korrespondierenden Antigen determinanten reagieren, wenn diese auf der Zelloberfläche exponiert ist. Gebundene Antikörper lassen sich ihrerseits fluoreszenzmikroskopisch nachweisen. Ein entsprechender Befund ist im Bild 8 festgehalten. Es sind einzelne, in Abrundung und Ablösung begriffene Zellbezirke erkennbar, sogenannte Virusplaques, die grüngelblich fluoreszieren. Dies bedeutet, dass der getestete monoklonale Antikörper mit einem oberflächlich liegenden Virusbestandteil reagiert hat. Es ist zu beachten, dass die in der Umgebung der Virusplaques liegenden Zellen noch nicht infiziert sind und demzufolge auch keine Fluoreszenz aufweisen. Die fluoreszenzmikroskopischen Befunde haben insgesamt ergeben, dass ein Teil unserer monoklonalen Antikörper mit der Oberfläche der infizierten Zelle reagieren. Andere Antikörper reagieren hingegen nur, nachdem die Zellen mit einem Fixationsmittel permeabel gemacht worden sind. Die entsprechenden Proteine sind also ausschliesslich intrazellulär lokalisiert.

Von einzelnen der Oberflächen-reaktiven Antikörper wissen wir inzwischen, dass sie die infizierten Zellen in Gegenwart von Komplement, einem normalen Blutbestandteil, zu lysieren vermögen. Man bezeichnet diese Antikörper als zytotoxische Antikörper.

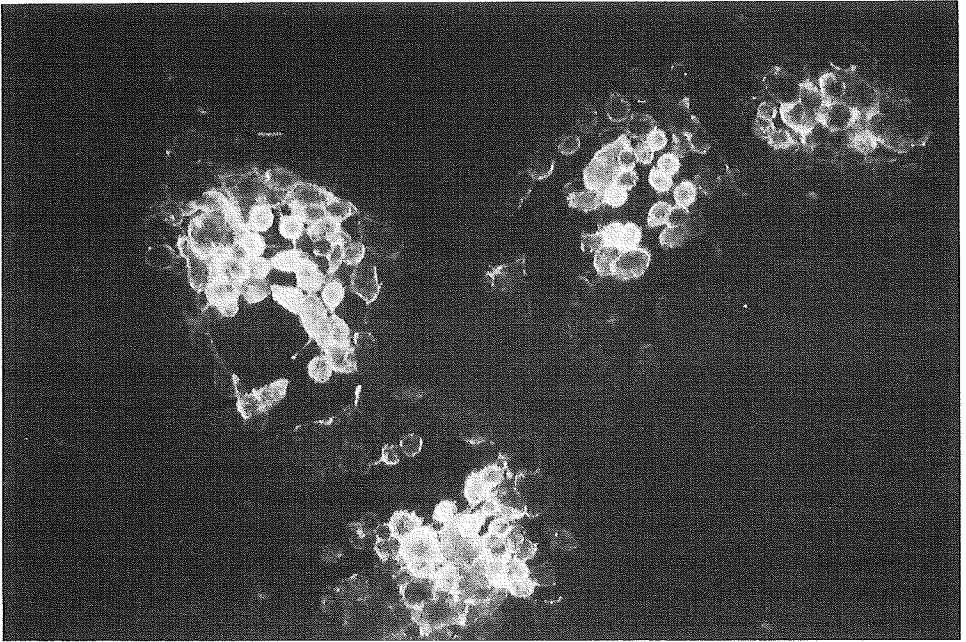


Bild 8 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis viraler Proteine auf der Zelloberfläche mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern. Im nativen Zustand, oder nach Fixation mit Paraformaldehyd, sind Zellmembranen für Antikörper undurchlässig. Da nicht alle Virusproteine auf der Zelloberfläche exponiert werden, ergeben die korrespondierenden Antikörper keine Fluoreszenz.

Fig. 8 Detection with monoclonal antibodies of viral proteins on the surface membrane of infected cells as revealed by fluorescence microscopy. In the native state or after fixation with paraformaldehyde cell membranes are not permeable for antibodies. Since not all of the viral proteins will be exposed on the cell surface the corresponding antibodies lack reactivity.

In einer weiteren Versuchsreihe haben wir geprüft, ob unsere Antikörper die Infektiosität reifer Viruspartikel zu neutralisieren vermögen. Zu diesem Zwecke wurden zunächst eine bestimmte Virusmenge und monoklonale Antikörper gemischt. Bringt man solche Virus-Antikörpergemische anschliessend auf Zellkulturen, so ist die Plaquesentwicklung ganz oder teilweise gehemmt, sofern der Antikörper Virus zu neutralisieren vermocht hatte. Das Ergebnis eines solchen Plaquesreduktionstests ist im Bild 9 wiedergegeben. Es ist zu erkennen, dass bei einem Antikörper eine vollständige und bei einem zweiten eine partielle Virusneutralisation stattgefunden hatte. Zwei weitere Antikörper wiesen keine entsprechende Wirkung auf.

Die bisherigen Untersuchungsergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden. Zahlreiche monoklonale Antikörper reagieren mit der Oberfläche der virusinfizierten Zellen. Einige dieser Antikörper vermögen diese Zellen in Gegenwart von Komplement zu lysieren, andere wiederum haben virusneutralisierende Eigenschaften.

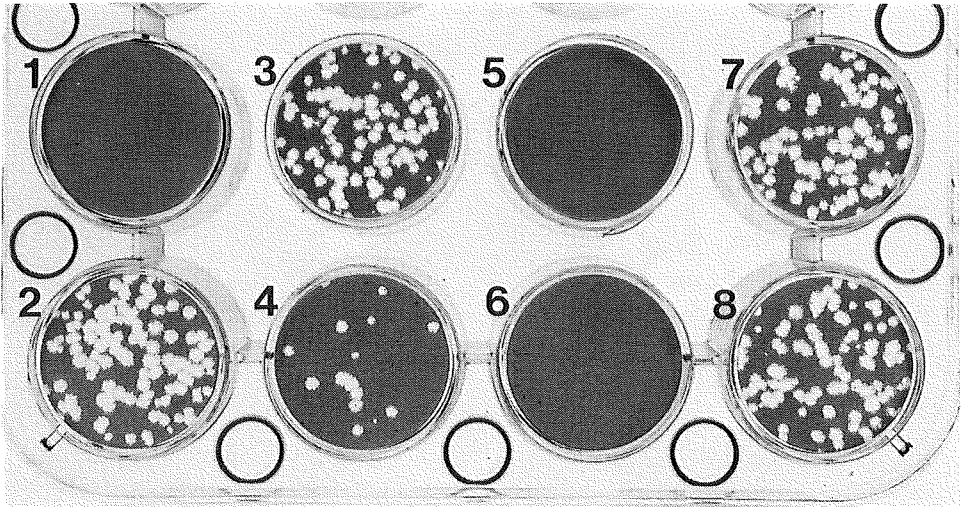


Bild 9 Beispiel eines Plaquesreduktionstestes mit monoklonalen Antikörpern. 1 und 4: vollständige respektive partielle Virusneutralisation; 2 und 3: fehlende Reaktivität; 5 und 6: nicht-infizierte Zellkontrolle; 7 und 8: Viruskontrolle.

Fig. 9 Plaques reduction assay with monoclonal antibodies. 1 and 4: complete and partial virus neutralisation, respectively; 2 and 3: lack of reactivity; 5 and 6: mock-infected cell control; 7 and 8: virus control.

Im letzten Experiment ging es darum, jene Proteine zu identifizieren, von denen wir inzwischen wussten, dass sie auf der Virusoberfläche und auf der infizierten Zellmembran exponiert waren. Hierzu löste man zunächst infizierte und radioaktiv markierte Zellen unter schonenden Bedingungen in die einzelnen Bestandteile auf. Im nächsten Schritt wurden Portionen dieser Proteinlösung mit den einzelnen monoklonalen Antikörpern zusammen gegeben. Schliesslich fällte man die entstandenen Antikörper-Protein-Komplexe aus und separierte die einzelnen Proteine in Akrylamidgelen. Da die Virusproteine radioaktiv markiert sind, liessen sich diese leicht identifizieren. Zusammen mit den früheren Befunden kann man aus Bild 10 entnehmen, dass die virusneutralisierenden Antikörper regelmässig die Virusproteine 7, 7A, 17 und 23 präzipitierten (Bahnen 2 und 3). Diese Proteine sind glykosyliert und stehen miteinander insofern in einem strukturellen Zusammenhang, als die Proteine 7A, 17 und 23 Spaltprodukte des Proteins 7 darstellen.

Die zytotoxisch wirkenden Antikörper präzipitierten die beiden Glykoproteine 3 und 12; dabei handelt es sich beim Protein 3 um ein Dimer von Protein 12.

Zusammenfassend haben die vorgestellten Experimente ergeben, dass zwei Glykoprotein-Komplexe des IBR/IPV-Virus gemeinsam dafür verantwortlich sind, dass die für die Immunitäts-Ausbildung bedeutsamen virusneutralisierenden und zytotoxischen Antikörper gebildet werden.

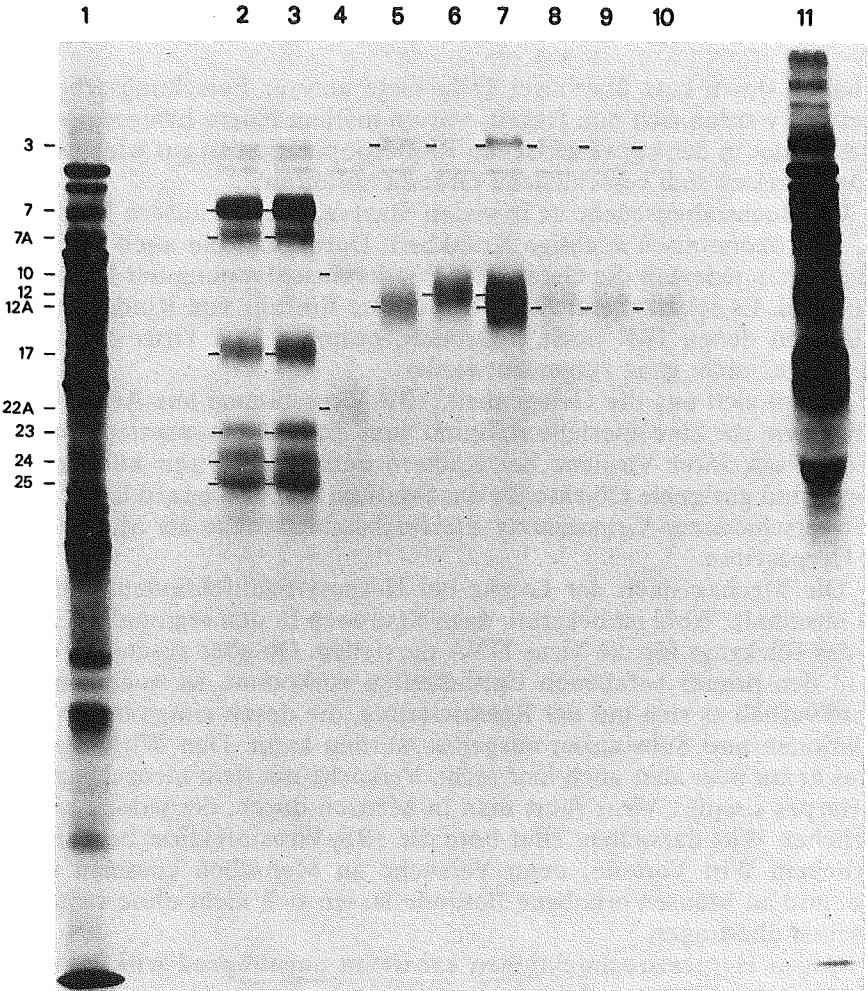


Bild 10 Radio-Immunpräzipitations-Test mit monoklonalen Antikörpern und Detergens-solubilisierten, virusinfizierten Zellproteinen. Die Proteinmarkierung mit $[^{35}\text{S}]$ Methionin erfolgte von der 7. bis zur 22. Stunde nach der Infektion. Die präzipitierten Proteine wurden in Acrylamidgelen aufgetrennt und autoradiographisch identifiziert. Bahn 1: solubilisierter, infizierter Zellproteine; Bahn 2 und 3: Präzipitate von zwei monoklonalen Antikörpern mit virusneutralisierenden Eigenschaften; Bahn 4: Präzipitat eines Antikörpers mit unbekannter Funktion; Bahn 5 bis 10: Präzipitate von zytotoxischen Antikörpern. Bahn 11: Präzipitat mit Immenserum eines Rindes.

Fig. 10 Radio-immunoprecipitation assay with monoclonal antibodies and detergent-solubilized virusinfected cell proteins. Proteins were labeled with $[^{35}\text{S}]$ methionine from 7 to 22 hours post infection. Immunoprecipitates were separated in acrylamide gels and evaluated by means of autoradiography. Lane 1: solubilized infected cell proteins; lane 2 and 3: precipitate of two monoclonal antibodies exhibiting virus neutralizing properties; lane 4: precipitate of an antibody with unknown function; lane 5 to 10: precipitates of cytotoxic antibodies. Lane 11: precipitate obtained with an immune cow serum.