



Doctoral Thesis

## Immediate-early genes of bovine herpesvirus 1 a structural and functional analysis

**Author(s):**

Fraefel, Cornel

**Publication Date:**

1993

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000904784> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

31. Aug. 1993

DISS. ETH No. 10159

**IMMEDIATE-EARLY GENES OF BOVINE HERPESVIRUS 1:  
A STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ANALYSIS**

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH  
for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by  
CORNEL FRAEFEL  
Dipl. sc. nat. ETH Zürich  
born December 16, 1964  
citizen of Uzwil (SG)

*A. F. F. Fraefel*  
*28. 8. 1993*

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. A. Fiechter, examiner  
Prof. Dr. K. Winterhalter, co-examiner  
PD Dr. H.-R. Fries, co-examiner  
PD Dr. M. Schwyzer, co-examiner

## Summary

I describe the immediate-early (or  $\alpha$ ) genes of bovine herpesvirus 1 (BHV-1). A detailed transcription map of BHV-1 genes, established earlier (108-110), provided the opportunity to subclone three IE genes and to determine their nucleotide sequences. The predicted IE proteins, designated BICP0, BICP4, and BICP22, exhibited clear amino acid homology to IE proteins of other herpesviruses, notably to the well-characterized ICP0, ICP4, and ICP22 of herpes simplex virus 1 (HSV-1). Similarities between the IE proteins of BHV-1 and HSV-1 also extend to functional properties. The ICP0 related proteins, for example, contain a putative DNA binding zinc-finger domain, and all IE proteins participate in gene regulation. I performed transient expression and CAT assays to assess these functional properties. ICP0 is a strong transactivator of various promoters, and transactivation depends on zinc ions. BICP22 is a general repressor, and BICP4 inhibits its own promoter and stimulates promoters of later kinetic classes.

Additional IE transcripts (IER6.3, IER1.5) were discovered which hybridized with probes from both genomic termini. These novel transcripts were characterized by Northern (RNA) blotting, primer extension, and polymerase chain reaction (PCR). IER6.3 is an unspliced precursor of IER1.5, and both arise by transcription over the TRS-U<sub>L</sub> junction of covalently joined genomic termini. Sequence analysis showed that the U<sub>L</sub> part of the spliced IE transcript is 3' coterminal with an unspliced 1.1 kb late transcript (LR1.1), and that both contain the same open reading frame (ORF) of 247 codons. The predicted protein exhibits homology with the ORF2 product of varicella-zoster virus (VZV) and the ORF3 product of equine herpesvirus 1 (EHV-1) and is designated the *circ*-encoded protein because of its possible origin from a circular BHV-1 genome. During analysis of the *circ* gene, a novel adjacent and oppositely oriented gene with homology to ICP27 of HSV-1 was discovered.

The BICP0 gene and the *circ* gene were analyzed in more detail. The products of both genes have been identified and localized in BHV-1 infected cells using rabbit sera raised against synthetic oligopeptides. Both genes have been expressed in a baculovirus expression system,

and the reactivity of recombinant proteins with antipeptide sera confirmed that they were correctly assigned to these genes.

The results described in this thesis allow to develop a model for the regulation of lytic and latent BHV-1 infection. On this basis, the construction of a virus mutant is recommended which could be used as a live vaccine to protect against BHV-1 infections, and which simultaneously could prevent latent infections. The properties of such a virus mutant could be studied in the natural host, and results could be applied to the related human herpesviruses.

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit beschreibe ich die unmittelbar frühen Gene ( $\alpha$ -Gene) des bovinen Herpesvirus Typ 1 (BHV-1). Aufgrund einer früher erstellten exakten Transkriptionskarte (108-110) konnten drei der  $\alpha$ -Gene kloniert und sequenziert werden. Die Aminosäure-Sequenzen der kodierten Proteine BICP0, BICP4 und BICP22 sind homolog zu bekannten  $\alpha$ -Proteinen anderer Herpesviren, insbesondere zu ICP0, ICP4, ICP22 von Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1).

Die Ähnlichkeiten zwischen den  $\alpha$ -Proteinen von BHV-1 und HSV-1 beschränken sich nicht nur auf homologe Domänen, wie zum Beispiel ein Zink-Finger-Motiv in den Polypeptidketten von ICP0 und BICP0, sondern umfassen auch die Lage der entsprechenden Gene auf dem Genom, sowie bestimmte funktionelle Eigenschaften. Mit Hilfe von in vitro Expressions-Experimenten und der CAT- (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase) Reporter-Gen-Methode konnte gezeigt werden, dass BICP0 verschiedene virale Promotoren stark stimuliert und dass diese Stimulation  $Zn^{2+}$ -abhängig ist. Mit der gleichen Methode wurde gezeigt, dass BICP22 ein starker Repressor ist, und dass BICP4 zwar seinen eigenen Promoter reprimiert, andere Promotoren jedoch zu aktivieren vermag.

Eine für Herpesviren völlig neue Eigenschaft wurde entdeckt, als in Northern (RNA) Blot Experimenten zwei  $\alpha$ -Transkripte (IER6.3 und IER1.5) auftraten, welche gleichzeitig mit markierten Fragmenten vom linken und vom rechten BHV-1 Genomende hybridisierten. Zudem wurde ein spät in der Infektion auftretendes Transkript (LR1.1) beobachtet, welches zwar nur mit markierten Fragmenten vom linken Genomende hybridisierte, jedoch coterminal war mit IER6.3 und IER1.5. Mit einer Reihe von Experimenten einschliesslich "primer extension" mit anschliessender Polymerase Kettenreaktion mit Primern von beiden Genomenden und Sequenzieren dieser Produkte konnte folgendes gezeigt werden: 1. IER6.3 ist eine ungespleisste Vorläufer-RNA von IER1.5; 2. Der gleiche Promoter, welcher in IR<sub>S</sub> die Transkription von IER4.2 und IER2.9 kontrolliert, wird in TR<sub>S</sub> für die Transkription von IER4.2 und IER1.5 verwendet; IER4.2 und IER1.5 besitzen die gleiche nicht-translatierte Leader-RNA; 3. IER1.5 wird auf die andere Seite des Genoms gespleisst und ist coterminal mit LR1.1;

4. IER1.5 und LR1.1 weisen einen gemeinsamen offenen Leseraster auf, welcher für das 247 Aminosäuren lange *circ* Protein kodiert. Homologe Proteine zu *circ* wurden im equinen Herpesvirus 1 (EHV-1) und in Varicella-zoster Virus (VZV), jedoch nicht in HSV-1 gefunden.

Während der Untersuchung des *circ* Gens wurde im linken Genomende ein neues Gen entdeckt, welches bezüglich der Lage im Genom und der Aminosäure-Sequenz des kodierten Polypeptides homolog ist zu ICP27 von HSV-1, jedoch nicht zur  $\alpha$ -Klasse gehört.

Aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften von BICP0 und *circ* schienen diese zwei Proteine von besonderem Interesse und wurden näher untersucht. Mit Hilfe von synthetischen Oligopeptiden und von damit produzierten polyklonalen Antikörpern konnten beide Genprodukte in BHV-1 infizierten Zellen nachgewiesen und lokalisiert werden. Die Expression dieser Gene im Baculovirus System und der Nachweis der entsprechenden Genprodukte mit Hilfe der Antikörper bestätigte, dass es sich dabei um die gewünschten BICP0- und *circ* - Proteine handelte.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Struktur und die Funktion der  $\alpha$ -Gene von BHV-1 ermöglichten die Erstellung eines Modells zur Regulation der lytischen und latenten BHV-1 Infektion. Aufgrund dieses Modells wird die Konstruktion einer Virusmutante vorgeschlagen, welche als Lebendvakzine eingesetzt vor einer BHV-1 Neuinfektion schützen und gleichzeitig eine latente Infektion verhindern soll. Die Eigenschaften einer solchen Virusmutante könnten im natürlichen Wirt untersucht und die gewonnenen Erkenntnisse gegebenenfalls auf die humanen Herpesviren übertragen werden.