

19. Nov. 1993

Diss. ETH No. 10326

**Viral structural proteins, genome, and *in vivo*
replication: A comparison between nuclear
and cytoplasmic types of *Adoxophyes orana*
granulosis virus**

THESIS

SUBMITTED TO THE
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZURICH

for the degree of Doctor of Natural Sciences

presented by

Xing Li

M.Sc. Huazhong Normal University

born 20 November, 1957

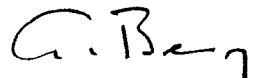
Citizen of China

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. G. Benz, examiner

Prof. Dr. T. Koller, co-examiner

1993



Abstract

The granulosis virus (GV) of *Adoxophyes orana* F.v.R. (Lep., Tortricidae) isolated from a dead larva found in the Valais (Switzerland) differs from other GVs. The wild isolate contains two replicational types, a nuclear type (N-type) and a cytoplasmic type (C-type). With this study the two are compared biochemically and serologically.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) showed that non-degraded granulin had a single band with a molecular weight (MW) of 28,000 daltons and the enveloped nucleocapsid (ENC) structure consisted of 16 polypeptides, whose MWs ranged from 12,000-110,000 daltons, but no difference could be found between both replication types. The high resolution 2-dimensional (2-D) gel electrophoresis resolved more than 40 viral polypeptides in the ENC structure. Some proteins with identical MWs but different isoelectric points (pI) were separated by 2-D gel electrophoresis. The pIs of the ENC proteins varied from pH 4.5-8.5. The ENC profiles of both replication types were similar; only in one group of proteins (31-32 kDa) were there any differences. This distinction in ENC structure may be determined by the different replication places.

Immunoblot was used to study serological characteristics of viral proteins from both replication types. The anti-granulin antibody (Anti-Pc) reacted strongly with the granulin antigen; it also cross-reacted with one of the major bands of the ENC, V31. The two anti-ENC antibodies (Anti-Vc from C-type and Anti-Vn from N-type) showed no differences in their reactions with the ENC antigens, but they cross-reacted differently with the granulin. Anti-Vc had a weak cross-reaction and Anti-Vn none at all. The serological relationships between the three anti-virus antibodies and healthy host proteins were also examined by immunoblot. The antibodies showed no serological reaction with any of the proteins from the midgut or the hemolymph, but in the healthy fat body tissue, the major tissue in GV replication, some interesting phenomena occurred. Although the anti-granulin antibody showed no cross-reaction with the fat body proteins, the two anti-ENC antisera cross-reacted with some host proteins. That Anti-Vn showed no cross-reaction with granulin, but reacted with one of the healthy fat body proteins implies a complicated relationship between virus and host during viral replication.

Changes in protein synthesis in three host tissues after AoGV infection were monitored. In the fat body, SDS-PAGE showed that one larval protein (L26) disappeared gradually, while two new proteins increased in quantity. These two increasing proteins were identified as belonging to the virus by immunoblot using the three antisera. One was the granulins (V28) and the other the major band of the ENC. Additionally, the synthesis of the low MW, DNA-binding protein of the ENC were also revealed in immunoblot experiments. With immunoblot the viral proteins could be detected early at day 4 after infection in the fat body and at day 7 in the hemolymph. The fact that no viral proteins could be found in the midgut by immunoblot shows that the AoGV is not replicated there.

AoGV DNA was analysed with 8 restriction endonucleases. Sal I, Eco RI, Hind III, Bgl I, Kpn I, Bam HI, Xho I, and Sma I cut the AoGV DNA to 19, 18, 16, 5, 5, 4, 2, 1 fragment(s), respectively. The estimated size of the AoGV genome is 89 kilobase pairs. To compare the genomes of two GV types and examine if some submolar DNA bands, representing genotypic heterogeneity, exist in the AoGV genome, a large number of DNA samples extracted from single larvae infected by either one of the two GV types was analysed with the four restriction endonucleases, Sal I, Eco RI, Hind III, and Bgl I. The restriction enzyme profiles between two types were the same and no such submolar band could be found in the examined samples. The viral genome of AoGV is rather homogeneous, probably because the isolate was taken from a single larva which might have been infected by a few virus particles only.

The conclusion is drawn that both GV types have similar genomes. However, the differences in the structural proteins and the ENC antibody properties, as well as the fact that the two types could be separated into "true breeding" lines, imply that some genetic differences must exist. Obviously, 70 sites for cutting the viral DNA were not enough to reveal these differences at the levels of the genomes.

Zusammenfassung

Das aus einer toten Larve aus dem Wallis (Schweiz) isolierte Granulosisvirus (GV) von *Adoxophyes orana* F.v.R. (Lep., Tortricidae) (AoGV) unterscheidet sich von anderen bekannten GV. Das primäre AoGV-Isolat enthält zwei verschiedene replizierende Typen, einen Kern-Typ (N-Typ) und einen Zytoplasma-Typ (C-Typ), entsprechend den unterschiedlichen zytologischen Bereichen, in denen sich die beiden Virustypen entwickeln. In der vorliegenden Untersuchung wurden reine Isolate beider Typen mit biochemischen und serologischen Methoden verglichen.

Untersuchungen mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zeigten, dass natives Granulin (sogen. Kapselprotein des parakristallinen Einschliessungskörpers) eine einzige Bande mit einem Molekulargewicht von 28,000 Dalton ergibt, während das umhüllte Nukleokapsid (ENC = enveloped nucleocapsid) 16 Polypeptide mit Molekulargewichten von 12,000 bis 110,000 Dalton enthält. Zwischen den beiden Replikationstypen konnte mit dieser Methode jedoch kein Unterschied gefunden werden. Mittels 2-dimensionaler Gelelektrophorese konnte eine höhere Auflösung erzielt werden, in der mehr als 40 Virusproteine in der ENC-Struktur sichtbar wurden. Einige Proteine mit denselben Molekulargewichten, aber verschiedenen isoelektrischen Punkten (pI), wurden mit dieser Methode getrennt. Die pI Werte der ENC-Proteine variierten von pH 4.5 bis 8.5. Die ENC-Profile der beiden Replikationstypen waren sehr ähnlich; nur in einer Gruppe von 31-32 kDa Proteinen zeigten sich Unterschiede. Diese sind möglicherweise auf die verschiedenen Replikationsorte der beiden Virustypen zurückzuführen.

Zur weiteren Charakterisierung der Proteinen aus den beiden Replikationstypen wurde das Immunoblot-Verfahren eingesetzt. Die Ergebnisse offenbarten verschiedene serologische Eigenschaften der drei produzierten Virus-Antisera. Der zur Kontrolle verwendete Anti-Granulin Antikörper (Anti-Pc) reagierte eindeutig mit seinem Antigen. Er kann aber auch mit mindestens einem Protein des ENC, nämlich V31, reagieren. Die zwei Anti-ENC-Antisera (Anti-Vc vom C-Typ und Anti-Vn vom N-Typ) reagieren gleich mit den ENC-Antigenen beider Virustypen. Sie zeigen jedoch unterschiedliche Kreuzreaktionen mit dem Granulin-Antigen: eine schwache Reaktion mit Anti-Vc, dagegen gar keine mit Anti-Vn.

Die serologische Verwandtschaft zwischen den drei Virus-Antisera wurde ebenfalls bezüglich ihrer Reaktion mit Proteinen aus gesunden larvalen Geweben geprüft. Mit Proteinen aus Mitteldarm und Hämolymphe zeigten die drei Antikörper keine serologische Reaktion. Im Fettkörper jedoch, dem Hauptvermehrungsort der Granulosisviren, ergaben sich einige interessante Resultate. Während der Granulin-Antikörper keine Kreuzreaktion mit Proteinen aus dem Fettkörper zeigt, reagieren die zwei ENC-Antikörper positiv mit bestimmten Proteinen im Fettkörper. Dass Anti-Vn absolut keine Kreuzreaktion mit Granulin hat, aber mit einem gesunden Fettkörper Protein reagieren kann, deutet auf eine komplizierte Beziehung zwischen Virus und Wirt während der Virusvermehrung hin.

Nach einer AoGV-Infektion liess sich in verschiedenen Geweben des Wirtes eine Veränderung in der Proteinsynthese nachweisen. So konnte mittels SDS-PAGE für den Fettkörper gezeigt werden, dass ein Wirtsprotein im Lauf der Infektion verschwindet, wohingegen zwei neu synthetisierte Proteine auftauchen. Diese zwei Proteine wurden durch Immunoblot als Virusproteine identifiziert: das eine ist identisch mit Granulin (V28), das andere ein ENC-Protein. Ein weiteres Virusprotein mit einem Molekulargewicht von 16 kDa (V16) ist ebenfalls mit den zwei ENC-Antikörpern nachgewiesen worden. Dabei handelt es sich um ein DNA-Bindungsprotein in der ENC-Struktur. Die Virusproteine können im Fettkörper am 4. Tag nach der Infektion mittels Immunoblot gefunden werden, in der Hämolymphe aber erst am 7. Tag. Im Mitteldarm konnten überhaupt keine Virusproteine nachgewiesen werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich das AoGV nicht im Mitteldarm vermehrt, wie für verschiedene andere GV nachgewiesen wurde.

Die AoGV DNA wurde mit 8 Restriktionendonucleasen analysiert. Die eingesetzten Enzyme (Sal I, Eco RI, Hind III, Bgl I, Kpn I, Bam HI, Xho I, Sma I) schneiden die DNA in 19, 18, 16, 5, 5, 4, 2, und 1 Fragmente. Die daraus geschätzte Grösse des AoGV Genoms beträgt 89 Kilobasenpaare. Um die Genome der beiden Replikationstypen auf submolare DNA-Banden (Hinweis auf genotypische Heterogenität) hin zu überprüfen, wurde eine grosse Zahl von DNA-Proben mit vier Enzymen (Sal I, Eco RI, Hind III, Bgl I) analysiert. Diese DNA-Proben wurden aus individuellen Larven extrahiert, die mit nur einem der beiden Replikationstypen in geringer Dosierung infiziert worden waren. Die DNA-Profile beider Typen sind

gleich; submolare DNA-Banden konnten in den geprüften Proben nicht gefunden werden. Das Genom des AoGV ist also recht homogen. Dies dürfte damit zusammenhängen, dass das ursprüngliche Isolat aus einer einzigen Larve gewonnen wurde, die möglicherweise durch nur wenige Viruspartikeln infiziert wurde.

Die Resultate sprechen einerseits dafür, dass die beide GV-Typen sehr ähnliche Genome haben. Andererseits zeigen die Unterschiede bei den Strukturproteinen der ENC und deren Antikörper-Eigenschaften, sowie die Tatsache, dass die beiden Typen als "rein-vererbende" Linien separiert werden konnten, dass genetische Unterschiede vorhanden sein müssen. Offensichtlich genügten 70 Schneidestellen der verwendeten Restriktionsenzyme nicht, diese Unterschiede zu erfassen. Es kann aber kein Zweifel darüber bestehen, dass eine detailliertere DNA-Analyse Unterschiede im Genom der beiden Virustypen zeigen würde.