



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **329193**

(13) **B1**

NORGE

(51) **Int Cl.**

C12N 7/00 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/45 (2006.01)
C07K 14/125 (2006.01)
A61K 39/17 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20006406	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1999.06.17 PCT/NL99/00377
(22)	Inng.dag	2000.12.15	(85)	Videreføringsdag	2000.12.15
(24)	Løpedag	1999.06.17	(30)	Prioritet	1998.06.19, EP, 98202054
(41)	Alm.tilgj	2001.02.19			
(45)	Meddelt	2010.09.13			
(73)	Innehaver	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek, Costerweg 50, NL-6701BH WAGENINGEN, Nederland Bernardus Petrus Hubertus Peeters, Lelystad, NL-, Nederland Olav Sven de Leeuw, Almere, NL-, Nederland Guus Koch, Lelystad, NL-, Nederland Arnoud Leonard Josef Gielkens, Lelystad, NL-, Nederland			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Paramyxovirus cDNA for fremstilling av medikamenter mot Newcastle-Disease hos fjærfe.			
(56)	Anførte publikasjoner	ADOLFO GARCÍA-SASTRE, Tibtech, vol. 16, nr. 5, 1998, s. 230-235, XP000411788 , NORBERT STÄUBER ET AL., Vaccine, vol. 13, nr. 4, 1995, s. 360-364, XP004057733 , — , EP 780475 A1 , P. CHAMBERS et al., Journal of General Virology, vol. 67, nr. 3, 1986, s. 475-486			
(57)	Sammendrag				

Det er beskrevet en fremgangsmåte for fremstilling av infeksjonsdyktig Newcastle Disease Virus (NDV) fullstendig fra klonet full-lengdet cDNA samt anvendelse av vaksiner og diagnostiske assays dannet med og avledet fra nevnte fremgangsmåte. Fremgangsmåten gir mulighet for å modifisere NDV-genomet ved hjelp av genetisk modifikasjon og tillater introduksjon av mutasjoner, delesjoner og/eller innsetninger. Fremgangsmåten kan bli brukt for å modifisere virulensen av NDV for derved å danne nye svekkede levende vaksiner med forbedrede egenskaper. Fremgangsmåten kan bli brukt til å modifisere den genetiske sammensetning av NDV for således å tillate fremstilling av levende NDV markør- vaksiner som kan bli serologisk skjelnet fra NDV feltstammer.

Oppfinnelsen angår fugleparamyksovirus cDNA som angitt i krav 1, RNA oppnådd fra slikt DNA, fremgangsmåte for fremstilling av infeksjonsdyktig kopi av fugleparamyksovirus som angitt i krav 18, vaksine omfattende slikt virus som
5 angitt i krav 25 samt en fremgangsmåte for å skjelne uvaksinerte dyr fra vaksinerte som angitt i krav 28, hvor dette kan anvendes for å behandle infeksjoner av fjærfe med Newcastle sykdomsvirus.

10 Necastle sykdomsvirus (NDV) er et av de mest mangfoldige og dødelige patogener for fugler. Den nesten samtidige opp treden av Newcastle sykdom som en tilsynelatende ny sykdom i flere forskjellige geografiske beliggenheter og den store variasjonen i type og alvorlighet av sykdommen har gitt visse problemer med nomenklatur.

15 Sykdommen har blitt betegnet pseudo fjærfepest, pseudo fjærfe byllepest, fuglepest, fuglegalsskap og fuglepneumoencefalitt. Viktigheten av sykdommen er i hovedsak grunnet utviklingen av fjærfeindustrien i løpet av det 20de århundre til en meget effektiv internasjonal industri som er
20 avhengig av intensiv handel mellom land.

Det er generelt antatt at de første utbrutt av Newcastle sykdom fant sted i 1926 på Java, Indonesia, og i Newcastle-upon-Tyne, England (Kraneveld, 1926; Doyle, 1927). Navnet Newcastle sykdom ble gitt av Doyle som et foreløpig navn
25 for å unngå beskrivende navn som kunne bli forvekslet med andre sykdommer. Det ble senere klart at andre mindre alvorlige sykdommer ble forårsaket av virus som ikke kunne skjernes fra NDV. I Amerika ble en relativt mild respiratorisk sykdom betegnet fuglepneumoencefalitt og ble vist å
30 være forårsaket av NDV (Beach, 1944). Innen et par år ble flere NDV isolater som ga ekstrem mild eller ingen sykdom i kyllinger foretatt omkring i verden.

De følgende metoder har blitt implikert i spredningen av sykdommen: 1) bevegelse av levende fugler, rovfugler, byt-

tefugler, brevduer og kommersielle fjærfe; 2) bevegelse av folk og utstyr; 3) bevegelse av fjærfeprodukter; 4) luftspredning; 5) forurenset fjærfefór; 6) forurenset vann; 7) ufullstendige inaktiverte eller heterogene vaksiner.

- 5 Ifølge OIE er Newcastle sykdom en sykdom hos fjærfe forårsaket av et virus av fugleparamyksovirus serotype 1 (APMV-1) som har en intracerebral patogenisitetsindeks (ICPI) i dagsgamle kyllinger på 0,7 eller større. Virulente virus kan også bli bekreftet ved tilstedeværelsen av flere basiske aminosyrer ved C-terminalen av F2-proteinet og
- 10 F(fenylanin) ved residu 117 som er N-terminalen av F1-proteinet. Det å ikke vise denne aminosyresekvens ville kreve karakterisering ved ICPI-tester. Ordet "fjærfe" refererer til tamfjærfe, kalkuner, broilere, ender, gjess, vaktler,
- 15 duer, fasaner, villduer og strutsefugl som blir odlet og holdt i fangenskap for avl, produksjon av kjøtt eller egg for konsumpsjon, eller for å spe på viltbestanden.

- I henhold til Alexander (1988) har tre panzootyper av Newcastle sykdom oppstått siden den første gjenkjennelse av
- 20 sykdommen. Den første representerte de opprinnelige utbrudd av sykdommen og synes å ha oppstått i Sydøst-Asia. Isolerte utbrudd, så som det i England i 1926 var tilfeldige introduksjoner før hovedmengden som sakte beveget seg gjennom Asia til Europa.

- 25 Et andre panzootisk tilfelle synes å ha startet i Midt-Østen sent på 1960-tallet og nådde de fleste land i 1973. Den raskere spredning av dette andre panzootiske tilfellet var sannsynlig forårsaket av hovedrevolusjonen innen fjærfeindustrien med vesentlig internasjonal handel.

- 30 Et tredje panzootisk tilfelle påvirket i hovedsak tamme fugler så som duer og brevduer (Vindevogel og Duchatel, 1988). Sykdommen oppsto tilsynelatende i Midt-Østen sent på 1970-tallet. I 1981 hadde den nådd Europa og spredde seg så raskt til alle deler av verden i hovedsak som et re-

sultat av kontakt mellom fugler ved konkurranser og utstillinger og den internasjonale handel med slike fugler.

I dag er Newcastle sykdom fremdeles spredd i mange land i Asia, Afrika, Amerika og Europa. Kun landene i Oseania synes å være relativt fri for sykdommen (Spradbrow, 1988).

NDV tilhører ordenen Mononegavirales, familien Paramyxovirida, subfamilien Paramyxovirina, genus Rubulavirus. Ved siden av NDV, generelt kalt fugleparamyxovirus type 1, åtte andre serotyper betegnet fugleparamyxovirus type-2 til -9 blir distingvert på basis av sitt antigene slektskap i hemagglutineringsinhiberingsforsøk og serumnøytraliseringsforsøk (Alexander, 1993).

Til tross for konsistensen av den serologiske gruppering finnes det enkelte kryssforhold mellom virus av de forskjellige serotyper.

Genomet av NDV er et enkeltkjedet RNA-molekyl av negativ polaritet, komplementert til messenger RNA som koder for virusproteiner. RNA-genomet er omtrent 15.200 nt stort og koder for de følgende genprodukter (listet fra 3'-ende til 5'-ende av det genomiske RNA): nukleokapsidprotein (NP), fosfoprotein (P), matriseprotein (M), fusjonsprotein (F), hemagglutinin-neuraminidase (HN), og stort polymeraseprotein (L) (Chambers et al., 1986).

RNA-materialet er kompleksbundet med NP-, P- og L-proteiner for å danne en ribonukleokapsidpartikkel (RNP) som er omgitt av en kappe som er foret på innsiden av M-proteinet. Kappen inneholder F- og HN-proteinene som er involvert i festing og en penetrasjon av vertscellen.

Replikasjon av NDV er lik strategien benyttet av andre paramyxovirinae. Det initielle trinn er festing av viruset til vertscellereseptorene skaffet til veie av HN-proteinet. Fusjon av den virale kappe med vertscellemembranen er av-

hengig av virkningen av både HN- og F-proteinene og resulterer i frigjøringen av RNP i cytoplasma hvor virusreplikasjonen finner sted.

Den virale RNA-avhengige RNA-polymerase (som er en del av RNP) danner komplementære transkripter som virker som mRNA-forbindelser og blir brukt av cellens translasjonsmaskineri for syntesen av virusproteiner. Grunnet akkumulering av NP-protein skifter RNA-polymerasekomplekset fra transkripsjon til replikasjon, noe som resulterer i syntesen av genomiske og antigenomiske RNA-molekyler av full lengde.

Nylig dannede RNP blir innkapslet ved cellemembranen ved virkningen av M-proteinet og F- og HN-proteinene som har akkumulert i den cellulære plasmamembranen. Nyliq dannede viruspartikler blir frigjort fra den infiserte celle med en knoppskytningsmekanisme. For mer detaljert informasjon omkring NDV-replikasjonen, se Peeples (1988). For en nylig oversikt av den molekylære biologi av paramyxovirinae (se Lamb og Kolakofsky (1996)).

Ved siden av kommersielle husfjærfe (dvs. kyllinger, kalkuner, fasaner, broilere, ender, gjess, duer) er en mengde fangede, semitamme og frittlevende fugler innbefattende migratoriske vannfugler, mottakelige for NDV og kan være primære infeksjonskilder (Kaleta og Baldauf, 1988).

Patogenisiteten av NDV-stammer er i stor grad forskjellig fra vert til vert. De mest resistente arter synes å være vannfugler, mens de mest mottakelige er flokkfugler som danner temporære eller permanente flokker. Kyllinger er svært mottakelige, men ender og gjess kan være infisert og vise få eller ingen kliniske tegn, selv med stammer som er dødelige for kyllinger.

Newcastle sykdom er komplisert i at forskjellige isolater og stammer av viruset kan indusere enorm variasjon i alvorligheten av sykdommen. Beard og Hanson (19184) grupperte

NDV-stammer og isolater i forskjellige patotyper som relaterer til sykdomstegn som kan bli observert i fullstendige mottakelige kyllinger: 1) viskerotopisk velogenisk NDV som danner akutte dødelige infeksjoner hvor blødningslesjoner er fremtredende i tarmen; og neurotropiske velogene NDV som gir høy dødelighet forløpet av respiratoriske og nevrologiske tegn, men ingen tarmlesjoner; 2) mesogent NDV som gir lav mortalitet, akutt respiratorisk sykdom og nervøse tegn i enkelte fugler; 3) lentogent NDV som gir mild eller ikke synlige respiratoriske infeksjoner eller til og med asymptomatisk enterisk NDV, avirulente virus som synes å replikere i hovedsak i tarmkanalen. Noe overlapping mellom tegnene assosiert med de forskjellige grupper har blitt rapportert.

Viruset kommer inn i kroppen via luftveiene og tarmkanalen eller via øyet. I trakea blir viruset spredd ved siliær virkning eller ved celle-til-celle-virkning. Etter initial multiplikasjon ved innføringsstedet blir virus ført under episoder av viraemia til lever, nyre og lunger. Virus fra enkelte stammer når vitale organer som lever og nyrer meget raskt, slik at fuglene kan dø før sykdomssymptomer er tydelige.

De fleste virus når sentralnervesystemet via blodet før større mengder antistoff eksisterer. En lang asymptomatisk bæretilstand antas å inntreffe i psittasines, utgjør en potensiell trussel for fjærfeindustrien. En langtids bæretilstand av både lentogene og velogene virus kan også eksistere i kyllinger (Heuschele og Easterday, 1970).

I løpet av replikasjonen av NDV er det nødvendig for prekursor-glykoproteinet Fo å bli spaltet til F1 og F2 for at virusavkommet skal være infeksjonsdyktig (Rott og Klenk, 1988). Denne posttranslasjonelle spaltning blir fremmet av vertscelleproteaser. Dersom spaltning ikke finner sted blir ikke-infeksjonsdyktige viruspartikler dannet og viral replikasjon kan ikke fortsette. Fo-proteinet av de viru-

lente virus kan bli spaltet av en mengde proteaser, men Fo-proteiner i virus av lav virulens er begrenset i sin følsomhet, og disse virus kan kun vokse in vivo i visse vertscelletyper og kan generelt ikke bli dyrket in vitro.

- 5 Lentogene virus replikerer kun i områder med trypsinlignende enzymer så som luftveiene og tarmkanalen, mens virulente virus kan replikere i en mengde vev og organer, noe som resulterer i dødelig systemisk infeksjon.

Aminosyresekvensering av Fo-prekursoren har vist at lavvirulensvirus har et enkelt arginin (R) som binder F2 og F1 kildene, mens virulente stammer har ytterligere basiske aminosyrer som danner to par så som K/R-X-K/R-R-F ved spaltningssetet. Videre starter F2-kjeden av virulente stammer generelt med et fenylalaninresiduum mens de ikke-
15 virulente stammer starter generelt med et leucin.

For et par stammer av NDV blir HN-proteinet også fremstilt som en prekursor som krever spaltning for å være biologisk aktivt (Garten et al., 1980; Millar et al., 1988).

Ved siden av spaltbarhet av F- og HN-proteinene kan andre
20 virale faktorer tilføre patogenisitet. Madansky og Bratt (1978, 1981a, 1981b) har vist at endringer i transkripsjon og translasjon kunne modulere vekst og celle-til-celle spredning av viruset og/eller cytopatogenisiteten.

Den initielle immunrespons på infeksjon med NDV er cellemediert og kan være påviselig så tidlig som 2 - 3 dager etter infeksjon med levende vaksinstammer. Dette forklarer sannsynligvis den tidlige beskyttelse mot angrep som har blitt funnet i vaksinerte fugler før en målbar antistoffrespons blir funnet (Gough og Alexander, 1973).
25

30 Ved omkring 1 uke etter infeksjon kan sirkulerende antistoff beskytte vertsorganismen fra reinfeksjon. I den tidlige fase er IgM involvert, fulgt av IgG. Titre og beskyt-

telse har en topp etter omkring 3 uker og synker gradvis dersom det ikke er noen forsterkning. Dette betyr at for eldre fugler er revaksineringer nødvendige.

Kun levende vaksiner administrert via respiratorisk rute
5 stimulerer antistoff i alle mukosale overflater så vel som i serum. Inaktivert vaksine, selv når den innføres via intramuskulær rute fremskaffer ikke lokal resistens i luftveiene til tross for høye konsentrasjoner av antistoff i serum.

10 Dette uthever viktigheten av levende vaksiner som er i stand til å presentere viralt antigen til de øvrige luftveier for å indusere både lokal og systemisk immunitet. Små dråper trenger inn i de nedre luftveier for derved å fremskaffe en i hovedsak humoral immunrespons, mens store
15 dråper stimulerer lokal immunitet i de øvre luftveier.

Følgelig gir aerosoler med et bredt dråpestørrelsesområde den beste totale lokale og humorale immunitet.

Det bør imidlertid bemerkes at til tross for intens vaksiner
20 ning med tilgjengelige vaksiner som danner høye nivå av antistofftitre, kan virus fremdeles bli funnet fra mukøse overflater.

Identifiseringen av Newcastle sykdom i USA førte til anvendelsen av inaktiverte vaksiner (Hofstad, 1953). Observasjonen at enkelte av de enzootiske virus ga kun mild sykdom
25 resulterte først i utviklingen av den mesogene levende vaksine Roakin (Beaudette et al., 1949) og etterfølgende, i utviklingen av den mildnere Hitchner B1 (Hitchner og Johnson, 1948) og LaSota (Goldhaft, 1980) stammer som nå er de hyppigst brukte levende vaksiner.

30 Fra en artikkel av A. Garcia-Sastre (Tibtech, vol. 16, no 5, 1998, s. 230 - 235) er det kjent rekombinante virus med spesifikke mutasjoner i kodende og ikke-kodende regioner i

deres genomiske RNA. Videre beskriver N. Stäuber et al (Vaccine, vol. 13, nr 4, 1995, s. 360 - 364) deteksjon av Newcastle disease-virus, NDV i fjærfevaksiner ved bruk av PCR og direkte sekvensering av amplifisert cDNA. I EP
 5 780475 er det beskrevet metoder i forbindelse med generering av ikke-segmenterte negativt-trådet RNA-virus (paramyksovirus) fra klonet cDNA, og i Journal of General Virology, vol. 67, nr. 3, 1986, s. 475 - 486 beskriver P. Chambers et al, at cDNA til 90% av NDV-genomet har blitt klonet
 10 og karakterisert.

NDV levende vaksiner kan bli oppdelt i to grupper, lentogene og mesogene. Mesogene stammer er egnet kun for sekundær vaksinerings av fugler grunnet deres større virulens. Immunresponsen øker ettersom patogenisiteten av den levende
 15 vaksine øker. Følgelig for å oppnå det ønskede beskyttelsesnivå uten alvorlig reaksjon blir for tiden brukte vaksineringsprogrammer benyttet som involverer sekvensiell bruk av progressivt mer virulente vaksiner eller levende vaksiner fulgt av inaktiverte vaksiner.

20 En av hovedfordelene ved levende vaksiner er at de kan bli administrert med billige masseapplikasjonsteknikker. En vanlig metode for applikasjon er via drikkevannet. Imidlertid må drikkevannsapplikasjon bli nøye overvåket ettersom viruset kan bli inaktivert av høy varme og lys og av
 25 virusidale urenheter i vannet.

Masseapplikasjon av levende vaksiner med spray og aerosoler er også meget populært grunnet lettheten som store antall fugler kan bli vaksinert på over en kort tid. Det er viktig å oppnå den korrekte partikkelstørrelse ved å kontrollere betingelsene hvorunder partiklene blir dannet.
 30

For tiden benyttede levende vaksiner har flere ulemper. Vaksinen kan fremdeles gi sykdomstegn avhengig av miljømessige betingelser og tilstedeværelsen av kompliserende infeksjoner. Følgelig er det viktig å benytte ekstremt milde

virus for primær vaksinerings og som et resultat er flere vaksinerings vanligvis nødvendige. Videre kan maternalt avledede antistoff forhindre riktig primær vaksinerings med levende lentogene vaksiner.

5 Inaktiverte vaksiner blir vanligvis dannet fra infeksjonsdyktig allantoïnvæske som bli behandlet med formalin eller betapropiolakton for å avlive virusene og blandet med passende adjuvant. Inaktiverte vaksiner blir administrert ved injeksjon, enten intramuskulært eller subkuttant. Inakti-
10 verte vaksiner er dyre å fremstille og tilføre.

Imidlertid blir inaktiverte olje-emulsjonsvaksiner ikke så uheldig påvirket av maternal immunitet som levende vaksiner og de kan bli benyttet i dagsgamle kyllinger. Fordeler med inaktiverte vaksiner er de lave nivå av uheldige reaksjoner
15 i vaksinerte fugler, i høye nivå av beskyttende antistoff, og den lange varighet av beskyttelsen. Ingen av de ovennevnte vaksiner kan serologisk bli adskilt fra villtype NDV.

Utviklingen av rekombinante virale vaksiner har vært av interesse for fjærfeindustrien i et antall år. Konseptet er
20 å sette inn gener av kritiske immuniserende epitoper av et sykdomsfremkallende stoff av interesse i et ikke-essensielt gen hos et vektorvirus. Vaksinerings med det rekombinante virus resulterer således i immunisering mot både vektorviruset så vel som det sykdomsfremkallende middel av interesse.
25 esse.

Flere typer virus har blitt foreslått som potensielle levende virale vaksiner for fjærfe. To fuglevirus som har stor oppmerksomhet er fuglekoppevirus (FPV) og herpesvirus
30 hos kalkuner (HVT). Fuglekoppevirus er et DNA-virus som har et stort genom og er således betraktet å ha tilstrekkelig rom til å bære fremmede gener.

Når de svekkes forårsaker ikke FPV klinisk sykdom og blir vanlig benyttet som en vaksine i kyllinger. HVT er også et DNA-virus og blir klassifisert som serotype III av Mareks sykdomsviruset (MDV) familien. HVT er ikke-patogent for
5 kyllinger, men kryssbeskyttende mot MDV og blir vanligvis benyttet for å vaksinere kyllinger mot Mareks sykdom.

Det har blitt vist at beskyttelse mot Newcastle sykdom kan bli induert ved å bruke rekombinante HVT- eller FPV-vaksiner (Morgan et al., 1992, 1993; Heckert et al., 1996;
10 Boursnell et al., 1990; Taylor et al., 1990).

Imidlertid ble igangsettingen av beskyttelse mot Newcastle sykdom etter vaksinerings med slike rekombinante vaksiner som uttrykker enten NDV F-proteinet eller både F- og HN-proteinene alvorlig forsinket sammenlignet med den som følger vaksinerings med en konvensjonell levende eller inaktivt NDV-vaksine, trolig fordi de rekombinante vaksiner ikke gir et bredt nok immunologisk spektrum av antigen relevante NDV-epitoper andre enn dem funnet på NDV-proteinet som blir uttrykt ved den rekombinante vaksine eller blir
15 ikke tilstrekkelig presentert for immunsystemet.
20

Videre ble lokal, (mukosal, respiratorisk eller enterisk) beskyttelse ikke effektivt induert i fugler vaksinert med det rekombinante materiale. Dette er en alvorlig ulempe siden vaksiner benyttet for primær vaksinerings mot respiratoriske sykdommer må indusere lokal immunitet for å forhindre infeksjon og spredning av virulente virus som infiserer kyllinger oppavlet under feltbetingelser.
25

Antistoff mot NDV som er i stand til å beskytte vertsorganismen kan bli målt i virusnøytraliseringstester. Imidlertid siden nøytraliseringsresponsen synes å være parallell med hemagglutineringsinhiberings(HI)responsen blir sistnevnte test ofte brukt for å undersøke den beskyttende respons, spesielt etter vaksinerings.
30

Antistoff mot både F- og HN-proteinene kan nøytralisere NDV. Imidlertid synes antistoff mot F-proteinet å indusere større nøytralisering enn dem rettet mot HN in vivo og in vitro forsøk (Meulemans et al., 1986).

- 5 Tilstedeværelsen av spesifikke antistoff mot NDV i serumet hos en fugl gir lite informasjon angående den infiserende stamme av NDV og har følgelig begrensende diagnostisk verdi.

10 Den totale tilstedeværelse av lentogene NDV-stammer i fugler i de fleste land og den nesten universelle bruk av levende vaksiner som ikke kan bli adskilt, i det minste ikke serologisk fra villtype NDV, betyr at kun påvisningen av infeksjon sjelden er tilstrekkelig årsak for kontrolltiltak å bli satt i gang. Siden feltskydd kan være et upålitelig
15 mål på den sanne virulens av viruset, er det nødvendig ytterligere å karakterisere som er funnet.

For tiden er den eneste metoden av Newcastle sykdomsdiagnose som tillater karakterisering av den infiserende stamme, virusisolasjon fulgt av patogenisitetstesting. For
20 tiden blir tre in vivo-tester benyttet for dette formål: 1) gjennomsnittlig dødstid (MDT) i egg; 2) intracerebral patogenisitetsindeks (ICPI) i dagsgamle kyllinger; 3) intravenøs patogenisitetsindeks (IVPI) i 6 uker gamle fugler.

Disse tester lider av et antall ulemper, så som tilgjengeligheten på dyr, dårlig reproducerbarhet og den relativt
25 lange varighet av forsøkene. Sist, men ikke minst tillater ikke disse testene en enkel serologisk identifisering av fjærfe vaksinert med en vaksine eller infisert med en villtypestamme.

30 Som et alternativ til in vivo tester har polymerase kjedereaksjonen (PCR) på god måte blitt brukt for å skjelne mellom virulente og ikke-virulente isolater (Stäuber et al.,

1995; Kant et al, . 1997)), men igjen er serologisk differensiering ikke mulig.

Oppavlingen av fjærfe og handel av deres produkter blir nå organisert på internasjonal basis, ofte under overvåkning
5 av multinasjonale selskaper. Trusselen fra Newcastle sykdom har vist seg som et hemmende moment i slik handel.

Riktig kontroll av Newcastle sykdom vil kun bli oppnådd når alle land rapporterer utbrudd. Imidlertid er internasjonale avtaler ikke enkle grunnet den enorme variasjon i omfanget av sykdomsovervåkingen i forskjellige land. Enkelte land
10 vaksinerer ikke, og vil ikke ønske noen form for NDV introdusert i hjemlig fjærfe fordi vaksinert fjærfe ikke kan bli skjelnet fra dem infisert med villtype NDV.

Andre tillater kun bruken av spesifikke levende vaksiner og
15 betrakter andre vaksiner som uakseptabelt virulente. Enda andre land har fortsatt tilstedeværelse av sirkulerende høyt virulente virus som ikke er kjent som sådan fordi stor sykdom blir maskert av vaksinerings.

I mange land eksisterer lover for å kontrollere utbrudd av
20 Newcastle sykdom som kan oppstå. Nasjonale kontrolltiltak blir rettet mot det å forhindre innføring og spredning. De fleste land har restriksjoner angående handel i fjærfeprodukter, i egg og levende fjærfe. De fleste land har etablert karanteneprosedyrer for import, spesielt for psittasine fugler.
25

Enkelte land har innført avlivningsmetoder med pålagt nedslakting av infiserte fugler, deres kontakter og produkter. Andre krever profylaktisk vaksinerings av fugler, spesielt ved fravær av utbrudd, mens enkelte har en politikk for
30 ringvaksinerings omkring utbrudd for å etablere en buffer-sone.

Det finnes klart et behov for bedre vaksiner og for bedre diagnostiske metoder som kan bli brukt for å kontrollere Newcastle sykdom. Grunnet både de store forskjeller i dosen som blir mottatt av individuelle fugler under massetilføring av levende vaksiner og variasjonen i nivå av maternal immunitet i unge kyllinger er postvaksineringsreaksjoner ved levende vaksiner uunngåelige. Dette er en av hovedbekymringene til bønder i land hvor vaksiner er pålagt.

- 10 Videre er mange vaksiner blandinger av subpopulasjoner. Når klonet kan disse subpopulasjoner være signifikant forskjellige fra hverandre i immunogenitet og patogenisitet (Hanson, 1988).

- 15 Imidlertid er den største ulempen med for tiden benyttede levende vaksiner og inaktiverte vaksiner det faktum at vaksinerte dyr ikke kan bli skjelnet fra infiserte dyr med for tiden benyttede undersøkelsesteknikker så som hemaglutineringsinhibering eller virusnøytraliseringsforsøk.

- 20 Virulente feltvirus kan fremdeles bli spredd i vaksinerte flokker siden sykdomssymptomer blir maskert av vaksiner. Siden virusisolering og karakterisering av virulens ved *in vivo*-teknikker ikke er mulige i stor skala, finnes et stort behov for nye og effektive svekkede levende vaksiner som kan bli serologisk skjelnet fra feltvirus.

- 25 Slike vaksiner, kalt NDV-markørvaksiner (og medfølgende diagnostiske metoder og sett) som bør gir det størst mulige immunologiske spektrum av antigenisk relevante NDV-epitoper og likevel bør være serologisk distinkt fra villtype NDV er enda ikke tilgjengelige.

- 30 Oppfinnelsen fremskaffer et fugleparamyxovirus-cDNA som tillater å danne genetisk modifiserte fugleparamyxovirus og en fugleparamyxovirusmarkørvaksine.

Innføringen av moderne molekylære biologiske teknikker har tillatt genetisk modifikasjon av mange RNA-virus innbefattende negativt kjedede RNA-virus. Denne teknikk blir ofte referert til som "revers genetikk". Det fremskaffes først
5 en (fullengdet) cDNA-kopi av det virale RNA hvorpå dette DNA transkriberes i mottakelige celler for å danne infeksjonsdyktige RNA som igjen kan replikere for å danne infeksjonsdyktige viruspartikler.

Generelt ved foregående modifikasjon av cDNA med standard
10 molekylære biologiske teknikker er det mulig å oppnå et genetisk modifisert RNA-virus. Imidlertid har dette aldri materialisert seg for NDV eller andre fugleparamyksovirus, og det har heller ikke vært mulig å danne minigenomfragmenter eller plasmider av fugleparamyksovirus-genomiske fragmenter for å studere replikative hendelser hos fuglepara-
15 myksovirus for derved å gi en forståelse av hvordan infeksjonsdyktige kopivirus kan konstrueres.

Overraskende, selv om det i denne beskrivelse det har nå blitt fullstendig etablert at genomet hos fugleparamyksovirus er det minste av alle paramyksovirusgenomer sekvensert til i dag, er spesielt den 5'-terminale endesekvens av
20 NDV-genomet mye lenger enn hva som tidligere hadde blitt etablert og var ventet ved sammenligning med andre *Paramyxoviridae*. Oppfinnelsen fremskaffer nå for første gang en full sekvens av et fugleparamyksovirusgenom og gir full-
25 lengdet eller minigenomisk lengdet cDNA av et slikt virus.

Oppfinnelsen fremskaffer herved fugleparamyksovirus-cDNA som angitt i krav 1 og som omfatter minst en nukleinsyresekvens tilsvarende 5'-terminal ende av genomet hos fugle-
30 paramyksovirus som tillater å danne infeksjonsdyktig kopi av fugleparamyksovirus hvor nevnte cDNA fortrinnsvis omfatter et fullengdet cDNA. Imidlertid fremskaffer oppfinnelsen også cDNA som omfatter minst en nukleinsyresekvens tilsvarende 5'-terminal ende av genomet hos fugleparamyksovirus for derved å tillate og danne et replikerende fuglepa-
35

ramyksovirus minigenom. Slike minigenomer kan fordelaktig bli brukt for å transkribere RNA og/eller uttrykke protein fra modifiserte nukleinsyresekvenser. Oppfinnelsen frem-
5 skaffer et cDNA i henhold til oppfinnelsen som minst delvis er avledet fra Newcastle Disease Virus, for eksempel hvor nevnte Newcastle Disease Virus er et lentogent virus, fortrinnsvis avledet fra en vaksinstamme så som LaSota-stamme ATCC VR-699.

Oppfinnelsen fremskaffer videre et cDNA i henhold til opp-
10 finnelsen ytterligere utstyrt med en modifikasjon så som en delesjon, innsetning, mutasjon, reversering eller annet i en nukleinsyre. For eksempel er et cDNA fremskaffet hvor nevnte modifikasjon omfatter en nukleinsyre som koder for et modifisert protease spaltingssete, for eksempel hvor
15 nevnte spaltingssete er et protease spaltingssete av fusjonsproteinet (F).

I enda en annen utførelsesform fremskaffer oppfinnelsen et cDNA i henhold til oppfinnelsen hvor nevnte modifikasjon omfatter en nukleinsyre som koder for et viralt hybridpro-
20 tein så som et hemagglutinin-neuraminidase (HN) hybridprotein som beskrevet i den eksperimentelle del av oppfinnelsen. Oppfinnelsen fremskaffer også et cDNA i henhold til oppfinnelsen hvor nevnte modifisering omfatter en delesjon i en nukleinsyre som koder for et viralt protein, så som et
25 matriseprotein (M).

Oppfinnelsen fremskaffer ytterligere et cDNA i henhold til oppfinnelsen som i tillegg er utstyrt med en nukleinsyre som koder for et heterologt antigen, fortrinnsvis hvor nevnte antigen er avledet fra et fuglepatogen som, for eksempel, beskrevet nedenfor. Et RNA og protein avledet
30 derav, fremskaffet fra et cDNA i henhold til oppfinnelsen er også fremstilt.

I de senere år har et antall ikke-segmenterte negativt kjedede RNA-virus blitt fullstendig karakterisert, og funda-

mentalt arbeid på replikasjonen og ekspresjonen av deres
genomer har kulminert i muligheten til å danne infeksjons-
dyktige virus fullstendig ved å transfektere celler med
klonet cDNA fra nevnte virus (oversikt av Conzelmann,
5 1996).

Til i dag har infeksjonsdyktige virus av ikke-segmenterte
negativt kjedede RNA-virus dannet fra klonet cDNA av for
eksempel rabiesvirus (Schnell et al., 1994; Conzelmann;
EP0702085A1). (Schnell et al., 1994; EP0702085A1), vesiku-
10 lært stomatitisvirus (Lawson et al., 1995; Whelan et al.,
1995), Sendaivirus (Garcin et al., 1995), meslingvirus (Ra-
decke et al., 1995; Schneider et al., 1997; EP0780475A1),
humant respiratorisk syncytialvirus (Collins et al., 1995),
rinderpestvirus (Baron and Barrett, 1997), og humant pa-
15 rainfluensavirus type 3 (Hoffman and Banerjee, 1997, Con-
zelmann; P0702085A1), (Schnell et al., 1994; EP00702085A1).

Imidlertid er alle av de ovennevnte infeksjonsdyktige vi-
ruskopier i stand til å vokse både *in vivo* så vel som *in*
vitro i vertsorganismer, vev eller celler av forskjellig
20 opprinnelse, noe som tillater lett cDNA-transfeksjon og re-
plikasjon og fremstilling av infeksjonsdyktige viruspartik-
ler i en egnet cellelinje.

Slik mulighet eksisterer ikke for NDV og klart ikke for
lentogene NDV-stammer som kan danne en vaksine. Virulens
25 av en slik NDV-stamme er assosiert med dets egenskap å re-
plikere i en bred samling celler, noe som er reflektert av
det faktum at virulente stammer lett kan replikere *in vitro*
og *in vivo*, mens vaksinestammer bare kan replikere *in vivo*.

Således med NDV oppstår en "catch 22"-situasjon. Selv om
30 forsøk på å danne en infeksjonsdyktig kopivirus fra for ek-
sempel infeksjonsdyktig cDNA muligens kan resultere i in-
feksjonsdyktige virus, er slike virus generelt ikke egnet
til bruk som en vaksine fordi de således fremstilte infek-
sjonsdyktige virus iboende er for virulente til å bli brukt

som vaksine; og det faktum at den kan bli dannet og replikert etter transfeksjon av cDNA på en cellelinje reflekterer dets lette spaltbarhet av Fo-proteinet til F1 og F2, som diskutert ovenfor, som er kjennetegn for virulens av et
 5 NDV.

Å bruke en vaksinstamme som opphavsmateriale for cDNA-materiale vil ikke løse dette problem idet en vaksinstamme, spesielt av en lentogen type ikke inneholder et lett spaltbart Fo-protein noe som gjør det umulig for første generasjonsvirus å fortsette og replikere. Cellen benyttet for
 10 transfeksjon vil ganske enkelt ikke være i stand til å støtte en eller flere replikasjonsrunder av vaksinetypevirus med et ikke-spaltet Fo-protein.

Oppfinnelsen fremskaffer nå elegant en løsning for dette
 15 problem og gir derved infeksjonsdyktige kopi-NDV, for eksempel for bruk i en vaksine.

Oppfinnelsen fremskaffer en fremgangsmåte for å danne infeksjonsdyktige kopier av Newcastle Disease Virus omfattende å transfectere celler som er i stand til å uttrykke
 20 viral NP-, P- og L-proteiner for kompleksdanning med viralt RNA med klonet fullengdet eller genomisk lengdet cDNA av nevnte virus og som videre omfatter å inkubere nevnte celler i vekstmedium omfattende proteolytisk aktivitet som tillater spaltning av Fo-proteinet av nevnte virus.

I Søkers system kan ko-transfeksjon av et plasmid som uttrykker NP bli sløyfet. NP blir sannsynligvis uttrykt fra fullengdet cDNA fordi NP-genet er det første genet etter 5' ende av det antigenomiske RNA. Siden eukaryotisk mRNA vanligvis er monocistronisk blir ekspresjon av distale gener
 30 ikke ventet. Imidlertid er det mulig å danne full-lengdet cDNA hvor de relative posisjoner av NDV-genene er endret. Dersom det første gen av et slikt cDNA er P- eller L-genet er det ikke nødvendig å uttrykke det tilsvarende genprodukt fra et ko-transfektet plasmid.

Som et alternativ til å bruke fullengdet cDNA, er det mulig å bruke to eller flere subgenomiske cDNA som danner replikasjonskompetente subgenomiske RNA og som sammen uttrykker den fulle mengde av fugleparamyxovirusproteiner. Selv om
5 RNA-delene blir pakket separat, kan de resulterende viruslignende partikler bli brukt for suksessive replikasjonsrunder ved hjelp av ko-infeksjon og komplementering av genfunksjoner.

I en foretrukket utførelsesform fremskaffer oppfinnelsen en fremgangsmåte hvor nevnte proteolytiske aktivitet er avle-
10 det fra et enzym, så som et trypsinlingende enzym, eller er avledet fra en blanding omfattende nevnte proteolytiske aktivitet. I en svært foretrukket utførelsesform omfatter nevnte vekstmedium allantoinvæske omfattende proteolytisk
15 aktivitet. Spalting av Fo-proteinet er nødvendig for dannelsen av infeksjonsdyktige virus. Det er mulig å danne infeksjonsdyktige virus fra lentogene stammer uten tilsetning av eksogent proteolytisk aktivitet. Ved å inokulere supernatanten av transfekterte celler i allantoinrommet av
20 embryonerte egg, er den proteolytiske aktivitet som er til stede i allantoinvæsken i stand til å spalte Fo-proteinet for å danne det fusjonskompetente F1 - F2 kompleks. Virioner med et slikt aktivert F-protein er i stand til å infisere mottakelige celler og replikasjon i celler som uttrykker
25 den ønskelige proteolytiske aktivitet gir infeksjonsdyktig avkom. Som et alternativ til å fremskaffe den ønskede proteolytiske aktivitet til supernatanten hos transfekterte celler, er det for eksempel mulig å bruke en celle som er permissiv for NDV og som allerede uttrykker nevnte
30 proteolytiske aktivitet. En slik cellelinje blir brukt for å danne infeksjonsdyktige lentogene NDV uten tilsetning av eksogen proteolytisk aktivitet. En slik cellelinje kan også bli dannet ved stabilt å transfekte en cellelinje med et gen som spesifiserer nevnte aktivitet. Videre er
35 det mulig å danne en stabil transfektert cellelinje som uttrykker villtype F-proteinet i viruskappen for derved å danne infeksjonsdyktige partikler (i seg selv ikke utstyrt

med genomisk informasjon som koder for villtype F-protein) med mulighet for å trenge inn i en celle. Innfanging av infeksjonsdyktige lentogene virus er også mulig ved infeksjon av transfekterte celler med et NDV-hjelpevirus. Et
 5 essensielt krav for et slikt hjelpevirus vil være at det kan bli selektert mot, for eksempel ved hjelp av nøytraliserende antistoff som fjerner hjelpeviruset, men som ikke reagerer med det lentogene virus. Endelig er det mulig å konstruere en stabil transfektert cellelinje som uttrykker
 10 ett, to eller alle av de tre essensielle NDV-proteiner, NP, P og L. Slike cellelinjer krever ko-ekspressjon av kun et subsett av de tre essensielle proteiner eller ingen ko-ekspressjon i det hele tatt for å støtte dannelsen av infeksjonsdyktige kopivirus.

15 I en foretrukket utførelsesform fremskaffer oppfinnelsen en fremgangsmåte hvor nevnte celler benyttes for transfeksjon er avledet fra primære eller sekundære kyllingceller eller cellelinjer. Beskrivelsen fremskaffer for eksempel CER- eller CEF-celler, som, som de fleste *in vitro*-celler generelt mangler de passende proteaser som er nødvendig for å
 20 spalte Fo-proteinet av NDV, for eksempel av stamme LaSota. Imidlertid kan celler avledet fra for eksempel andre fugler også bli brukt.

Oppfinnelsen fremskaffer videre en fremgangsmåte for å
 25 danne infeksjonsdyktige Newcastle Disease Virus-kopier omfattende å transfektere celler med klonet fullengdet eller genomisk-lengdet cDNA av nevnte virus som for eksempel identifisert i figur 3 og som ytterligere omfatter å inkubere nevnte celler i vekstmedium omfattende proteolytisk
 30 aktivitet som tillater spalting av Fo-proteinet av nevnte virus, og som ytterligere omfatter å gjenvinne infeksjonsdyktige virus ved å dyrke nevnte celler og inokulere materiale avledet fra nevnte dyrkede celler i allantoinrommet av embryonerte egg. Slikt materiale omfatter for eksempel
 35 (innhøstede eller frysetinte) celler eller celleavfall eller supernatant avledet fra nevnte cellekultur.

For eksempel angir beskrivelsen en fremgangsmåte for å gjenvinne infeksjonsdyktige virus hvor supernatanten av transfekterte CEF monolag ble inokulert inn i allantoïnrommet hos embryonerte egg. Fire dager senere ble allantoïnvæsken innhøstet, analysert i et hemaglutineringsassay og passert videre i egg.

I tillegg fremskaffer oppfinnelsen en fremgangsmåte som ytterligere omfatter å passere nevnte infeksjonsdyktige kopi av Newcastle Disease Virus ved å innhøste allantoïnvæske og re-inokulere embryonerte egg.

I en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen er det fremskaffet en fremgangsmåte hvor nevnte virus er et lentogent virus, for eksempel avledet fra et avirulent felttilfelle av NDV eller fra en vaksinstamme av NDV, så som LaSota-stammen av NDV. Videre er det fremskaffet en fremgangsmåte for å modifisere et fugleparamyksovirusgenom ved hjelp av genetisk modifikasjon som tillater introduksjonen av en eller flere mutasjoner, delesjoner og/eller innsetninger eller andre modifikasjoner. For eksempel er det mulig å svekke eller modifisere virulensen av fugleparamyksovirus ved å modifisere cDNA, for eksempel som koder for et viralt protein så som V-proteinet, og klonere nevnte modifiserte cDNA i cDNA av full lengde og danne infeksjonsdyktige kopivirus fra nevnte fullengdede cDNA, for derved å danne nye NDV-stammer eller nye svekkede levende vaksiner med forbedrede egenskaper.

Ved siden av svekkelse av modifikasjonen av genprodukter, er det også mulig å svekke fugleparamyksovirus ved modifikasjon av nukleotidsekvenser som er involvert i transkripsjon og/eller replikasjon. Slike modifiseringer resulterer i svekkede stammer som uttrykker villtypelignende F-proteiner som er spaltbare både *in vitro* og *in vivo* i et bredt område av celler, og er som et resultat mer immunogene enn de klassiske vaksinstammer.

I en foretrukket utførelsesform er det mulig å svekke eller modifisere virulensen av et fugleparamyksovirus så som Newcastle Disease Virus, ved å modifisere et proteasespaltingssete av et viralt protein ved å modifisere cDNA som koder for nevnte spaltingssete, og videre å klonere nevnte cDNA i genomisk lengdet cDNA av for eksempel Newcastle Disease Virus og danne infeksjonsdyktige kopier av Newcastle Disease Virus. Nevnte spaltingssete er for eksempel et proteasespaltingssete i F- eller HN-proteinet av Newcastle Disease Virus. Svekkelse er generelt begrenset til reduksjon av virulens, men det er nå også mulig å bruke en relativt a-virulent stamme av NDV og fremskaffe avkommet fra en slik stamme med øket virulens, for eksempel ved å utstyre den med en øket tendens til å replikere i en spesiell celletype. Det er nå således mulig å tilegne distinkte virulensattributter til NDV.

Det er også mulig antagelig å modifisere fugleparamyksovirus så som et Newcastle Disease Virus omfattende å modifisere cDNA som koder for minst en del av et viralt protein som inneholder minst en immunodominant epitop, og ytterligere å klonere nevnte cDNA i genomisk lengdet cDNA av Newcastle Disease Virus og danne infeksjonsdyktige Newcastle Disease Virus.

For eksempel er det mulig (ytterligere) å modifisere NDV, for eksempel å fremstille en infeksjonsdyktig kopi av NDV (vaksine) som har blitt beskrevet, hvor det fremstilles en rekombinant NDV markørvaksine, en markørvaksine som inneholder mest mulige eller nødvendige immunologiske spektrum av antigen relevante NDV-epitoper, og likevel er serologisk distinkt fra villtype NDV fordi en distinkt, serologisk relevant epitop eller markør har blitt fjernet ved rekombinante teknikker. Det er således mulig å modifisere den antigene struktur av fugleparamyksovirus så som NDV for således å tillate fremstilling av for eksempel en levende NDV-markørvaksine som kan bli serologisk adskilt fra fugleparamyksovirus feltstammer.

I en utførelsesform fremstilles infeksjonsdyktige NDV-kopier hvor HN-proteinet av NDV har blitt modifisert ved å rekombinere cDNA som koder for en del av nevnte HN-protein med cDNA som koder for en del av HN-protein avledet fra et fugleparamyksovirus, for eksempel type 2 eller type 4. Nevnte hybrid HN-protein virker som en serologisk markør for den infeksjonsdyktige NDV kopistamme således fremstilt eller kan virke til å endre tropien av fugleparamyksoviruset eller andre celler og/eller vev. Disse såkalte markørstammer tillater fremstilling av vaksiner som er et uunnværlig verktøy for å påvise prevalensen av NDV i kommersielle flokker omkring i verden. Videre vil applikasjonen i stor skala av slike markørvaksiner føre til fullstendig utryddelse av NDV ved en prosess av intensiv utvelgelse og fjerning av infiserte flokker.

Videre er det mulig å danne en infeksjonsdyktig NDV kopistamme som uttrykker ett eller flere antigener fra andre patogener og som kan bli brukt for å vaksinere mot flere sykdommer. Et slikt infeksjonsdyktig NDV kopivirus, som for eksempel omfatter et heterologt cDNA som koder for et heterologt protein fremstilt fra for eksempel fugleinfluenza (AI) (Hemagglutinin (H5 og H7) og Neuraminidase). Fugleleukosevirus (ALV) (env protein (gp85)), kyllinganemivirus (CAV) (VP1+VP2), Mareks sykdomvirus (MDV) (glykoprotein B (gB), (gH), infeksjonsdyktige laringotrakeitisvirus (ILT) (gB, gH, gD), infeksjonsdyktige bursalsykdomvirus (IBDV) (VP2 og VP3), kalkunrinotrakeitisvirus (TRT) (fusjon (F)protein), fugleparamyksovirus -2, -3, -6 (PMV) (F-protein, hemagglutinin neuraminidase (HN) eller andre infeksjonsdyktige bronkittvirus (IBV) (peplomerprotein, nukleoprotein), reovirus (sigmaprotein), adenovirus pneumovirus, salmonella enteritidis, kampylobakter jejuni, Escherichia coli, Bordetella avium (tidligere Alcaligenes faecalis), Haemophilus paragallinarum, Pasteurella multocida, Ornithobacterium rhinotracheale, Riemerella (tidligere Pasteurella) anatipestifer, Mycoplasmata (M. gallisepticum, M

synoviae, M. mereagris, M. iowae), eller Aspergilli (A. flavus, A. fumigatus).

Det kan herved dannes fugleparamyxovirus eller stammer avledet derav som kan bli brukt som en vaksinevektor for ekspresjonen av antigener fra andre fuglepatogener. Flere egenskaper gjør NDV til en ideell vaksinevektor for vaksiner mot respiratoriske eller intestinale sykdommer. 1) NDV kan lett bli dyrket til meget høye titre i embryonerte egg.

2) Massedyrking av NDV i embryonerte egg er relativt billig.

3) NDV-vaksiner er relativt stabile og kan enkelt bli administrert ved hjelp applikasjonsmetoder så som via drikkevannet eller ved spraying eller aerosolformulering

4) Den naturlige infeksjonsrute av NDV er via luftveiene og/eller tarmkanalen som også er de naturlige hovedruter for infeksjon av mange andre fuglepatogener.

5) NDV kan indusere lokal immunitet til tross for tilstedeværelsen av sirkulerende maternal antistoff.

Det har blitt vist at NDV har kraftige antineoplastiske så vel som immunstimulerende egenskaper (for en oversikt se Schirmacher et al., 1998) [Schirmacher, V., Ahlert, T., Steiner, H. -H., Herold-Mende, C., Gerhards, R. og Hagmüller E. (1998) Immunization with virus-modified tumor cells. *Seminars in Oncology* 25: 677-696]. Selv om NDV ikke synes å være i stand til å replikere produktivt i normale humane celler, ble en selektiv NDV-mediert avliving av humane kreftceller merket. Etter lokal NDV-terapi ble viral onkolyse og fullstendige remisjoner av humane tumorxenografts observert i nakne mus. Dette har ført til bruken av NDV for kreftterapi. Imidlertid er det et problem at slik applikasjon kan være begrenset til lokal behandling.

NDV-infeksjon induserer interferoner, kjemokiner og andre potensielt viktige genprodukter, og introduserer pleiotro-

piske immunstimulatoriske egenskaper i tumorceller. Dette konsept har blitt brukt for fremstillingen av autologe tumorcellevaksiner som består av ferskt opererte prøver som har blitt infisert med NDV. Denne type vaksine blir kalt
 5 autolog tumorvaksine-NDV eller ATV-NDV (Schirrmacher et al., 1998). De NDV-infiserte celler blir inaktivert med gammastråling, noe som forhindrer celledeling, men som likevel tillater replikasjon av NDV i cytoplasma hos infiserte celler. Etter inokulering av pasienter med ATV-NDV
 10 blir T-celler rekruttert via NDV-induserte kjemokiner. Enkelte av disse T-celler kan uttrykke en T-cellereseptor som kan reagere med peptider fra tumorassosierte antigener i kompleks med hovedhistokompatibilitetskompleks klasse 1 molekyler ved celleoverflaten. Denne interaksjon resulterer
 15 i induksjonen av en cytotoksisk T-cellerespons som resulterer i spesifikk dreping av autologe tumorceller.

Det er således mulig at repertoaret og mengden av kjemokiner og immunstimulatoriske proteiner indusert av NDV-infeksjon blir modulert. Det er således mulig å fremstille re-
 20 kombinant NDV som har blitt modifisert for å inkorporere og uttrykke (a) heterologe gen(er). Slikt rekombinant NDV kan bli brukt for å modifisere repertoaret og mengden av immunstimulatoriske proteiner i infiserte celler. Slikt rekombinant NDV kan inkorporere og uttrykke gener som koder for
 25 humane interferoner, kjemokiner eller andre immunstimulatoriske proteiner. Nevnte rekombinante NDV kan bli brukt for fremstilling av ATV-NDV som er kraftigere enn konvensjonell ATD-NDV. For eksempel: cytokiner IFN- α , - β , TNF- α , IL-1, IL-6; kjemokiner RANTES, IP-10; andre gener så som HSP, ACTH,
 30 endorfin, iNOS, EPA/TIMP, NF κ B). De pleiotrope immunstimulatoriske egenskaper av NDV kan også bli brukt som en adjuvant for vaksinerings av dyr og mennesker mot infeksjonsdyktige sykdommer.

I tillegg er det gitt en metode for å danne en kondisjonalt
 35 dødelig NDV delesjonsmutant som kan bli brukt som en selvbegrenset ikke-overførbar (bærer)vaksine. En NDV dele-

sjonsmutant ble dannet som er ute av stand til å uttrykke matriseproteinet (M) som er involvert i knoppskyting av NDV ved den indre cellemembranen. Oppfinnelsen gir for eksempel en fenotypisk komplementert NDV-stamme som er ute av stand til å uttrykke M-proteinet som fremdeles er i stand til å infisere celler og spre seg ved hjelp av celle-til-celle-overføring. Imidlertid er mutantviruset ute av stand til å danne infeksjonsdyktig avkom på ikke-komplementerende celler. Dette viser at fenotypisk komplementerte NDV dele-
sjonsmutanter kan bli brukt som sikre selvbegrensende vaksiner som er ute av stand til å spre seg inn i miljøet. En slik ikke-overførbar vaksine kombinerer den viktigste fordel, dvs. effektivitet med den viktigste fordel ved avlivede vaksiner, dvs. sikkerhet.

Oppfinnelsen gir Newcastle Disease Virus eller stammer avledet derav, for eksempel ved å passere eller ytterligere dyrke i embryonerte egg eller passende celler som er avledet fra infeksjonsdyktige kopivirus som kan oppnås ved fremgangsmåte gitt av oppfinnelsen.

For eksempel er NDV fremskaffet som har blitt modifisert i det minste på en måte for å danne infeksjonsdyktige Newcastle Disease Virus kopier som er svekket, modifisert i virulens, antigenisk modifisert, som uttrykker et heterologt antigen eller er ikke-overførbare eller kombinasjoner derav.

Med dette gir oppfinnelsen NDV-vaksiner som er særpreget for eksempel ved å bære distinkte virulensattributter eller distinkte antigene karakteristika, det være seg for markør-vaksineformål og/eller for å uttrykke heterologe antigener avledet fra andre patogener, det være seg i overførbar og/eller ikke-overførbar form.

En slik vaksine kan være en avlivet eller en levende vaksine. Foretrukket er en slik vaksine en levende vaksine, men avlivede vaksiner som gitt ved oppfinnelsen er gunstige

under de forhold hvor en levende vaksine ikke er, eller er kun litt anvendbar, for eksempel på grunn av handelsbegrensninger eller andre tilstander satt av sykdomskontrollerende myndigheter.

- 5 Oppfinnelsen gir nye og effektive vaksiner som kan bli serologisk adskilt fra feltvirus og andre gamle virustyper. Slike nye vaksiner, kalt NDV-markørvaksiner gir det størst mulige immunologiske spektrum av antigen relevante NDV-epitoper og er likevel serologisk distinkte fra villtype
10 NDV ved å anvende medfølgende diagnostiske metoder og sett.

- Oppfinnelsen gir en mulighet for å distingvere uvaksinerte dyr eller dyr vaksinert med en NDV-vaksine i henhold til oppfinnelsen fra dyr som er infisert med villtype NDV eller vaksinert med en umodifisert mesogen eller lentogen NDV-
15 vaksinstamme omfattende å ta minst en prøve (så som serum, blod, egg eller øyevæske) fra nevnte dyr og bestemme i nevnte prøve tilstedeværelsen av antistoff rettet mot en immunodominant epitop eller markør uttrykt av nevnte villtype eller umodifiserte NDV, men ikke av en vaksine i hen-
20 hold til oppfinnelsen.

Det kan benyttes antistoff som er rettet mot HN- eller F-proteinet av NDV, for eksempel et hybridprotein som beskrevet i den eksperimentelle del av foreliggende beskrivelse.

- Det er eksempelvis mulig å benytte en enkel og rask hemaglutineringsinhibering (HI) test benyttet for å skjelne mellom vaksinerte dyr og infiserte dyr. Dyr vaksinert med en markørvaksine hvor det fullstendige globulare hode av HN av NDV har blitt erstattet med den tilsvarende del av HN av en annen serotype vil ikke indusere antistoff mot HN av NDV og
30 vil følgelig ikke inhibere hemaglutinering av erytocyter med NDV-virioner.

Ved å bruke markørvaksinevirioner i HI-testen blir antistoff mot det hybride HN-protein påvist og kan bli brukt

som et mål på effektiviteten av vaksinerings. Som et alternativ blir en ELISA som påviser antistoff mot F-proteinet av NDV benyttet for å måle vaksinerings effektiviteten.

5 Ved siden av HI-testen kan et ELISA bli brukt for å bestemme tilstedeværelsen av antistoff mot HN av NDV. Antigenet som skal benyttes i et slikt forsøk, er for eksempel HN av NDV som er uttrykt ved rekombinante DNA-teknikker eller et konserverte peptid fra HN av NDV.

10 Et blokkerende ELISA kan også bli brukt. I dette tilfelle blir ett eller flere monoklonale antistoff mot konserverte epitoper av HN av NDV benyttet for å bestemme hvorvidt konkurrerende antistoff er til stede i prøver fra vaksinerte dyr. ELISA-testene kan fordelaktig bli brukt dersom markørvaktsinen inneholder et kimerisk HN-protein alene eller
15 når et par epitoper av HN av NDV er erstattet.

Oppfinnelsen er ytterligere forklart i den eksperimentelle del av foreliggende beskrivelse.

EKSPERIMENTELL DEL

MATERIALER OG METODER

20 Standard kloningsprosesser ble utført ifølge Sambrook et al. (1989), hvis intet annet er nevnt. Alle konstruksjoner omfattende DNA-fragmenter som ble generert ved bruk av polymerase-kjedereaksjon (PCR), ble verifisert ved sekvensanalyse. I primersekvensene som oppgis i det følgende, til-
25 svarer de understrekede nukleotider NDV-sekvenser, og posisjonen i NDV-genomet oppgis. Nukleotidsekvensen med restriksjonsstillinger som ble brukt for kloning, oppgis med fet skrift.

Celler og viruser

CER-celler (Smith et al., 1976) ble dyrket i GMEM/EMEM (1:1) som inneholdt 5% føtalt kalveserum og 2% av en antibiotikablanding som inneholdt 1000 U/ml Penicillin, 1000
 5 µg/ml Streptomycin, 20 µg/ml Fungizone, 500 µg/ml Polymixin B og 10 mg/ml Kanamycin. QT35-celler (Moscovici et al., 1977; Cho, 1982) ble dyrket i medium levert av GibcoBRL/Life Technologies (katalog-nr. 041-91536; patentert sammensetning fra Fort Dodge) supplementert med 5% FCS og
 10 2% antibiotikablanding. QM5-celler (Antin og Ordahl, 1991) ble dyrket i M199-medium supplementert med 10% tryptosefosfatkraft, 10% FCS og 2% antibiotikablanding.

NDV-stammen LaSota ble ervervet fra ATCC (ATCC VR-699), og ble passert to ganger i embryonerte egg. Før vi startet med
 15 konstruksjonen og kloningen av cDNA, ble viruset plakk-renset ved tre runder med plakkrensning på primære kyllingembryofibroblaster (CEF). Med dette formål ble viruset titrert på CEF-celler dyrket i GMEM/EMEM (1:1) som inneholdt 5% føtalt kalveserum, 2% antibiotikablanding, 5% allantoinvæske, 30 mM MgCl₂, 200 µg/ml DEAE-dekstran (Sigma) og 0,8%
 20 agar Nobel (Difco). Virus fra den tredje runde med plakkrensning (benevnt klon E13-1) ble dyrket i embryonerte egg, og fire dager etter innpodingen, ble allantoinvæsken samlet og lagret i alikvoter ved -70°C. Rekombinant fjærfekoppervirus fpEFLT7pol (Britton et al., 1996; heretter benevnt
 25 FPV-T7), som uttrykker T7-RNA-polymerase, var en velvillig gave fra Dr. Michael Skinner, og ble dyrket på QT35-celler.

Isolasjon av viralt RNA

Alle manipulasjoner ble utført i RNase-frie glass- eller
 30 plastvarer, og alle oppløsninger ble dannet med RNase-fritt vann som var blitt behandlet med 1% dietylpyrokarbonat (DEPC) og sterilisert ved autoklavbehandling. Virus ble pelletisert fra allantoinvæske ved sentrifugering ved 21.000 rpm i 70 minutter i en Beckman SW40-rotor ved 4°C.

Pelleten ble gjensuspendert i homogenisert buffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 5 mM Edta; 0,5% SDS) og behandlet med Proteinase K (200 µg/ml) i 90 minutter ved 37°C under konstant bevegelse. Lysatet ble ekstrahert to ganger med et likt volum fenol/kloroform (1:1) pH 5,4 og én gang med et likt volum kloroform. Det virale RNA ble felt fra den vandige fase ved tilsetning av 0,1 volumer 3M NaOAc pH 5,3 og 2,5 volumer 100% etanol. Felningen ble samlet ved sentrifugering, vasket én gang med 70% etanol, gjensuspendert i vann og lagret i aliquoter ved -70°C.

Revers transkripsjon

Viralt RNA (1,5 µg) ble blandet med 500 ng primer i et volum på 12 µl og inkubert i 10 minutter ved 70°C. 4 µl 5×RT-buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂; GibcoBRL/Life Technologies), 2 µl 0,1M DTT og 2 µl 10 mM dNTP'er (2,5 mM hver) ble satt til, og blandingen ble inkubert i 2 minutter ved 42°C. Revers transkripsjon ble utført i et endelig volum på 20 µl ved tilsetning av 200 enheter revers transkriptase (Superscript II; GibcoBRL/Life Technologies) fulgt av inkubasjon i 60 minutter ved 42°C.

Polymerasekjedereaksjon (PCR)

Alle PCR-reaksjoner som ble brukt for å bestemme 3'- og 5'-ende av NDV-genomet (se nedenfor) ble utført ved bruk av Taq-DNA Polymerase (Perkin Elmer). For kloning av enkelte NDV-gener eller store subgenomiske cDNAer ble enten korrekturlesende DNA-polymerase Pwo eller blandinger av Taq og Pwo (Expand High Fidelity Kit eller Expan Long Template Kit) brukt ifølge leverandørens anvisninger (Boehringer Mannheim). Alle prøvene ble inkubert i 2 minutter ved 94°C før starten av det oppgitte antall PCR-sykluser. Etter det angitte antall PCR-sykluser ble prøvene inkubert ved forlengelsestemperaturen i minst 3× varigheten av forlengelsestiden av PCR-syklusen. PCR-fragmenter ble rensset direkte ved bruk av High Pure PCR Product Purification Kit

(Boehringer Mannheim) eller etter agarosegelelektroforese ved bruk av QiaexII-ekstraksjonssett (Qiagen) i det vesentlige som beskrevet av leverandørene.

Sekvensanalyse

5 Alle sekvenser ble bestemt ved bruk av PRISM Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer). Reaksjonsblandinger (5 µl) ble underkastet 25 sykluser med lineær amplifikasjon (10 sek. ved 94°C, 5 sek. ved 50°C og 4 min. ved 60°C) i en GeneAmp2400-termosykliserer. Deretter
10 ble reaksjonsblandingerne felt med etanol, vasket én gang med 70% etanol, gjensuspendert i 15 µl TSR-buffer, vasket én gang med 70% etanol, gjensuspendert i 15 µl TSR-buffer (Perkin Elmer) og oppvarmet i 2 minutter ved 94°C før de ble fylt på en Applied Biosystems AB310 automatisk sekven-
15 sierer.

Nukleotidsekvensene av primerne som ble brukt for å sekvensiere det fullstendige genom av NDV-stammen LaSota, ble enten avledet fra publiserte sekvenser eller fra sekvenser som ble fastslått under dette sekvensieringsprosjekt. Pri-
20 merne vises i tabell 1.

Kloning og sekvensiering av 3'- og 5'-termini av genomet av NDV-stammen LaSota

Nukleotidsekvensen av 3'- og 5'-termini av NDV-genomet ble bestemt ved bruk av RACE-prosesser (rask amplifikasjon av
25 cDNA-ender). NDV-RNA ble brukt i en revers transkripsjonsreaksjon i et endelig volum på 20 µl ved bruk av primer p360 (5'-GGCGATGTAATCAGCCTAGTGCTT-3'; nt 14756-14779) som ble avledet fra den publiserte sekvens av L-genet av NDV (Yusoff et al., 1987). Det enkeltkjedede DNA (2,5 µl av RT-
30 blandingen) ble satt til 8 pmol ankerprimer ALG3 (5'-CACGA-ATTCATATCGATTCTGGATCCTTC-3') og ligert over natten ved romtemperatur i 20 µl reaksjonsblanding som inneholdt 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM MgCl₂, 10 µg/ml BSA, 25% PEG, 1 mM

HCC, 20 μ M ATP og 10 enheter T4-RNA-ligase (New England Biolabs) som beskrevet av Tessier et al. (1986). 1 μ l av ligeringsreaksjonsproduktet ble brukt som sjablone i en PCR-reaksjon ved bruk av primerne p375 (5'-CAATGAATTCAAAG-GATATTACAGTAACT-3'; nt 14964-14983) og ALG4 (4'-GAAGGATCCA-GAATCGAATAG-3'). Sistnevnte primer er komplementær med ankerprimeren ALG3. PCR-betingelsene (40 sykluser) var som følger: 1 min. ved 94°C; 1 min. ved 55°C; og 2 min. ved 72°C. PCR-produktene ble rensset og klonet i T-vektor pBluescriptII-TSK (Ichihara og Kurosawa, 1993). Alternativt ble de rensede PCR-produkter behandlet med Klenow DNA-polymerase I for å danne butte ender, og klonet inn i HincII-stillingen av plasmidet pGEM4Z (Promega). 13 uavhengige kloner (8× pBluescriptII-TSK og 5× pGEM4Z) ble sekvensiert for å bestemme nukleotidsekvensen av 5'-ende av genomet av NDV-stammen LaSota. Nukleotidsekvensen av 3'-ende ble bestemt ved to uavhengige metoder. I metode I ble primeren ALG3 ligert til 3'-ende av det virale DNA ved bruk av T4-RNA-ligase som beskrevet av Schütze et al. (1995). Reaksjonsblandingen (endelig volum 10 μ l) inneholdt 2,5 μ g NDV-RNA, 100 pmol ALG3, 1 μ l 10× T4-RNA-ligasebuffer (500 mM Tris-HCl, pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP), 1 μ l DMSO, 1 μ l 10 μ M heksaminkoboltklorid, 1 μ l RNasin (Promega) og 10 enheter T4-RNA-ligase (New England Biolabs). Blandingen ble inkubert over natten ved romtemperatur, og 5 μ l av ligeringsreaksjonsproduktet ble brukt som sjablone i en revers transkripsjonsreaksjon ved bruk av ALG4 som primer. 1 μ l av RT-reaksjonsproduktet ble brukt i en PCR-reaksjon ved bruk av primerne ALG4 og p376 (5'-GAGCCTTAAGGAGCTGCTCGTACTGATC-3'; nt 137-164), som ble avledet fra den publiserte sekvens av 3'-ende av NDV (Ishida et al., 1986). PCR-betingelsene var som beskrevet ovenfor for 5'-RACE. I metode II ble 3'- og 5'-ende av det virale NDV-RNA ligert med hverandre ved bruk av T4-RNA-ligase ved bruk av de samme betingelser som beskrevet ovenfor for metode I. 5 μ l av ligeringsblandingen ble brukt som sjablone i en revers transkripsjonsreaksjon ved bruk av primeren p360. 1 μ l av RT-reaksjonsproduktet ble brukt i en PCR-reaksjon ved

bruk av primerne p375 og p376 og PCR-betingelsene som ble beskrevet ovenfor for 5'-RACE. PCR-produktene ble behandlet med Klenow-DNA-polymerase I for å danne butte ender og klonet inn i HincII-stillingen av plasmidet pGEM4Z (Promega).
 5 10 uavhengige kloner (4 fra metode I og 6 fra metode II) ble sekvensiert for å bestemme nukleotidsekvensen av 3'-ende av genomet av NDV-stammen LaSota.

Konstruksjon av en transkripsjonsvektor

En transkripsjonsvektor med lavt kopitall ble konstruert ved bruk av plasmidet pOK12 (Vieira og Messing, 1991) som grunnleggende replikon. Plasmidet pOK12 ble spaltet med PvuII, og DNA-fragmentet som inneholdt replikasjonsopphavet og Kanamycin-resistens-genet, ble isolert. Dette DNA-fragment ble ligert til et Eco47III-AflIII-fragment (AflIII-stillingen ble gjort butt ved bruk av Klenow-DNA-polymerase I)
 10 fra transkripsjonsvektor 2,0 (en snill gave fra Dr. Andrew Ball; Pattnaik et al., 1992). Fra det dannede plasmid slettet man et XbaI-NheI-fragment for å eliminere så mange ensartede restriksjonsstillinger som mulig. Det dannede plasmid ble benevnt pOLTV5 (fig. 1). Transkripsjonsvektoren pOLTV5 inneholder den T7-DNA-avhengige RNA-polymerasepromoter fulgt av ensartede StuI- og SmaI-restriksjonsstillinger, det autokatalytiske ribozym fra hepatitis delta-virus (HDV) og transkripsjonstermineringssignalet fra bakteriofagen T7. DNA-fragmenter som er klonet mellom StuI- og
 15 SmaI-restriksjonsstillingene, kan transkriberes enten *in vitro* eller *in vivo* ved bruk av T7-RNA-polymerase. Etter transkripsjonen inneholder 5'-ende av de dannede transkripter to G-residuer som kodes for av plasmidet. Grunnet den autokatalytiske virkning av HDV-ribozymet tilsvarende 3'-ende av transkriptene det nøyaktige terminale nukleotid av det klonede DNA-fragment (Pattnaik et al., 1992).
 20
 25
 30

Konstruksjon av minigenomplasmider

For å undersøke kravene til replikasjon og transkripsjon av NDV, ble minigenom-plasmider konstruert som inneholdt 3'- og 5'-terminale partier av NDV som flankerte et reporter-gen som erstattet alle NDV-gener (fig. 2). DNA-fragmenter som tilsvarte 3'- og 5'-terminale partier av NDV, ble generert ved hjelp av PCR ved bruk av Pwo-DNA-polymerase (30 syklusser; 15 sek. ved 94°C, 30 sek. ved 50°C og 30 sek. ved 72°C) og ved bruk av plasmider som inneholdt de ovennevnte 3'- og 5'-RACE-fragmenter som sjabloner (se ovenfor).

3'-parti (nt1-119) ble generert ved bruk av primerne 3UIT (5'-ACCAAACAGAGAATCCGTGAGTTACGA-3', nt 1-27) og SEAP3 (5'-ATCGATACTGGTCAGCATGCTGGCAGAAGGCTTTCTCG-3', nt 102-119). 5'-parti (nt 14973-15186) ble generert ved bruk av primerne SEAP5 (5'-GCATGCTGACCAGTATCGATATTACAGTAACTGTGACT-3', nt 14973-14990) og 5NDV (5'-ACCAAACAAAGATTTGGTGAATGACGA-3', nt 15158-15186). De to DNA-fragmenter ble sammenføyd i en overlappende PCR (overlappingen vises med kursive bokstaver i de ovenfor viste primersekvenser) ved bruk av primerne 3UIT og 5NDV. Det dannede DNA-fragment, som er et fusjonsprodukt av 3'- og 5'-ende av NDV adskilt med 20 nukleotider, ble fosforylert ved behandling med T4-polynukleotid kinase og klonet i begge retninger inn i transkripsjonsplasmidet pOLTV5 (fig. 1), som ble spaltet med StuI og SmaI, og defosforylert med kalvetarmfosfatase (Boehringer Mannheim). Til slutt ble SEAP-genet (som kodet for utsondret alkalifosfatase) isolert fra plasmidet pSEAP-Basic (Clontech) ved spaltning med SphI og ClaI, og klonet mellom SphI- og ClaI-stillingene mellom 3'- og 5'-ende av NDV. De dannede plasmider ble benevnt henholdsvis pOLTV535 og pOLTV553. *In vivo*- eller *in vitro*-transkripsjon ved bruk av T7-RNA-polymerase av plasmidet pOLTV535 gir opphav til antigenomisk RNA ([+]-RNA), mens transkripsjon av plasmidet pOLTV553 gir opphav til genomisk RNA ([-]-RNA).

Plasmidene pOLTV535N0 til -N5 og pOLTV553N0 til -N5 ble generert ved å innføre selvkomplementære oligonukleotider i ClaI-stillingen plassert mellom SEAP-genet og 5'-ende av NDV i henholdsvis pOLTV535 og pOLTV553 (se fig. 2). Oligonukleotidene som ble brukt, var: N0: 5'-CGCGAGCTCG-3'; N1: 5'-CGCGAGSCTCG-3'; N2: 5'-CGCGAGCGCTCG-3'; N3: 5'-CGCGAGCWGCTCG-3'; N4: 5'-CGCGAGCATGCTCG-3'; N5: 5'-CGCGAGCASTGCTCG-3' (W = A eller T; S = C eller G).

10 Modifikasjon av T7-promoter i plasmidene pOLTV535 og pOLTV553

For å generere *in vitro*- eller *in vivo*-transkripter som inneholder de autentiske 5'- og 3'-terminale ender av NDV, ble T7-promoter i plasmidene pOLTV535 og pOLTV553 modifisert slik at transkripsjonen ville starte ved det første nukleotid av 3'- eller 5'-terminal ende av NDV.

Primere ble utviklet som inneholdt 1) en BglI-restriksjonsstilling, 2) sekvensen av T7-promoter (vist i kursiv) som var modifisert slik at de to G-residuer i enden av T7-promoter var erstattet med et A-residuum, og 3) 3'- (nt 1-21) eller 5'-ende (nt 15164-15186) av NDV. Primerne BGL3F2 (5'-GATATGGCCATTCAGGCTTAATACGACTCACTATAACCAAACAGAGAATCCGTGAG-3') og SEAP3 (se ovenfor) ble brukt for å generere et DNA-fragment som inneholdt den modifiserte T7-promoter og hele 3'-ende av NDV opptil starten av SEAP-genet i pOLTV535. På lignende måte ble et DNA-fragment generert som inneholdt den modifiserte T7-promoter og hele 5'-ende av NDV opptil enden av SEAP-genet i pOLTV553, ved bruk av primerne BGL5F2 (5'-GATATGGCCATTCAGGCTTAATACGACTCACTATAACCAAACAAAGATTTGGTGAATG-3') og SEAP5. De dannede fragmenter ble spaltet med henholdsvis BglI og SphI (3'-ende) eller BglI og ClaI (5'-ende) og brukt til å erstatte BglI-SphI-fragmentet i pOLTV535 eller BglI-ClaI-fragmentet i pOLTV553. De dannede plasmider ble benevnt henholdsvis pOLTV735 og pOLTV753. Plasmidene pOLTV735N3 og pOLTV753N3 ble generert ved å innføre et selvkomplementært oligonukleotid (5'-CGCGAGCWGCTCG-

3'; W = A eller T) i ClaI-stillingen plassert mellom SEAP-genet og 5'-ende av NDV i henholdsvis pOLTV735 og pOLTV753.

Konstruksjon av SEAP-reporterplasmider

Plasmidet pCIneoSEAP ble konstruert ved å klonе et XhoI-
 5 ClaI-fragment (ClaI-stillingen ble gjort butt ved bruk av Klenow-DNA-polymerase I) som inneholdt SEAP-genet fra plasmidet pSEAP-Basic (Clontech) mellom XhoI- og SmaI-stillingene av den eukaryotiske ekspresjonsvektor pCIneo (Promega). Det sistnevnte plasmid inneholder humant cytomegalovirus
 10 (hCMV)-promoter i tillegg til bakteriofag T7-promoter. For å undersøke og kvantifisere SEAP-ekspresjonen av transkripter generert fra kun T7-promoter, ble et annet plasmid konstruert, som manglet hCMV-promoter. Med denne hensikt ble hCMV-promoter slettet fra pCIneo ved delvis spaltning
 15 med HindIII, fulgt av en fullstendig spaltning med BglII. DNA-fragmentet (nt 756-5469 ifølge Clontech's nummerering) fra hvilket hCMV-promoter var blitt slettet, ble isolert, behandlet med T4-DNA-polymerase for å generere butte ender, og gjensirkularisert ved bruk av T4-DNA-ligase. Det dannede
 20 plasmid ble benevnt pCIneoD. Til slutt ble SEAP-genet isolert fra pSEAP-Basic i form av et MluI-AccI-fragment og klonet inn i pCIneoD mellom MluI- og ClaI-stillingene. Det dannede plasmid ble benevnt pCIneoD-SEAP.

Transfeksjoner

25 Celler ble podet i 24-brønners kulturskåler, dyrket over natten til 60-80% konfluens og infisert med en m.o.i. på 1 med FPV-T7 i 1 time ved 37°C. Cellene ble transfisert med 0,5 µg minigenomplasmid-DNA ved bruk av 3 µl "LipofectA-MINE" og OptiMem i det vesentlige som beskrevet av leverandøren (GibcoBRL/Life Technologies). Etter inkubasjon i 4
 30 timer (CER-celler) eller 16 timer (QM5-celler) ved 37°C ble cellene enten infisert med NDV ("Dutch" virulent isolat nr. 152608; 200 µl pr. brønn) i 1 time med en m.o.i. på 5, eller latt være uinfisert. Podestoffet ble sugd ut og erstattet.

tet med 1 ml fullstendig medium, og cellene ble ytterligere inkubert ved 37°C.

For kotransfeksjoner ble celler dyrket i 6-brønners kultur-skåler og infisert med FPV-T7 som beskrevet ovenfor. Cellene ble kotransfisert med 0,25 µg minigenomplasmid-DNA, 0,4 µg pCIneoNP, 0,2 µg pCIneoP og 0,2 µg pCIneoL(c) eller pCIneo ved bruk av enten 8 µl LipofectAMINE eller 9 µl Fu-Gene6 (Boehringer Mannheim). For å generere infiserende virus, ble minigenomplasmidet erstattet med et transkripsjonsplasmid som inneholdt fullengdet NDV-cDNA.

Kvantifisering av SEAP-aktiviteten

Mengden SEAP som ble utsondret i mediet av transfiserte celler, ble målt i éngangs 96-brønners plater ved bruk av "Phospha-Light Chemiluminescent Reporter Assay for Secreted Alkaline Phosphatase"-settet i det vesentlige som beskrevet av leverandøren (Tropix). Kjemiluminescensen ble kvantifisert ved bruk av en væskescintillasjonsteller (Wallac 1450 mikrobeta PLUS).

Kloning og sekvensiering av cDNA'er som strakk seg over hele genomet av NDV-stammen LaSota

For å klonere og sekvensiere hele genomet av NDV-stammen LaSota, ble store subgenomiske cDNA-kloner generert ved hjelp av RT-PCR og klonet inn i pGEM-T. Første kjedes cDNA-syntese ble utført ved bruk av primeren 3UIT som beskrevet ovenfor, og 1 µl av RT-reaksjonsproduktet ble brukt i en PCR-reaksjon ved bruk av Expand Long Template PCR-settet (Boehringer Mannheim). PCR bestod av 5 sykluser med 10 sek. ved 94°C, 30 sek. ved 58°C og 6 min. ved 68°C, fulgt av 10 sykluser med 10 sek. ved 94°C, 30 sek. ved 58°C og 6 min. ved 68°C, hvor forlengelsestiden ved 68°C ble hevet med 20 sek. pr. syklus. PCR-fragmentene ble klonet i pGEM-T ved bruk av pGEM-T-klonesettet i det vesentlige som beskrevet av leverandøren (Promega). Ligeringsblandinger ble trans-

formert inn i *E. coli*-stammen SURE II (Stratagene). To uavhengige RT-PCR-reaksjoner (A og B) ble utført, og hver gav et lignende sett cDNA-kloner. Nukleotidsekvensen av de subgenomiske cDNA-kloner ble bestemt ved bruk av NDV-spesifikke primere (tabell 1) og ved hjelp av primere som flankerte innføyelsene. Etter sammenligning av nukleotidsekvensen av A- og B-rekken av kloner, ble gjenværende tvetydigheter løst opp ved sekvensiering av de relevante partier av en tredje uavhengig rekke cDNA'er (C-serien). Nukleotidsekvensen av NDV-stammen LaSota vises på fig. 3.

Konstruksjon av en fullengdet genomisk cDNA-klon av NDV

Full-lengdet NDV-cDNA ble satt sammen i transkripsjonsplasmidet pOLTV5 ved bruk av pOLTV535 som utgangsplasmid. DNA-fragmentene ble føyd sammen ved overlappende partier ved bruk av vanlige restriksjonsenzymmer som vist på fig. 4B. I en rekke klonetrinn ble et plasmid (benevnt p535-DI) konstruert som inneholdt nukleotidene 1-3521 og 12355-15186 holdt adskilt med en ClaI-stilling som ble generert ved å føye sammen ClaI-stillingene i posisjon 3521 og 12355. I en annen rekke kloningstrinn ble et plasmid (benevnt pGEM-B) konstruert som inneholdt deler av NDV-genomet omfattende nukleotidene 3521-12355 (ClaI-fragment). For å forenkle kloningen ble det sistnevnte ClaI-fragment merket med Chloramphenicol-resistens (Cm)-genet fra plasmidet pACYC184 (Chang og Cohen, 1978). Med denne hensikt ble Cm-genet isolert fra pACYC184 ved hjelp av PCR ved bruk av primerne CAT-F (5'-GCGTACGTCTAGACTGGTGTCCCTGTTGATACCGG-3') og CAT-R (5'-GCTCTAGACGTACGACCCTGCCCTGAACCGACG-3'). PCR ble utført med Pwo-DNA-polymerase, og bestod av 30 sykluser med 30 sek. ved 94°C, 45 sek. ved 60°C og 60 sek. ved 72°C. Det dannede PCR-fragment ble spaltet med BsiWI og klonet inn i den ensartede BsiWI-stilling av pGEM-B, hvilket gav pGEM-B(CAT). ClaI-fragmentet fra pGEM-B(CAT) ble klonet inn i den ensartede ClaI-stilling av p535-DI, hvilket gav pNDFL(CAT). Til slutt ble Cm-genet fjernet fra dette plasmid ved spaltning med BsiWI fulgt av gjenligering og trans-

formasjon av *E. coli*-stammen DH5a. Det dannede plasmid ble benevnt pNDFL+ og inneholder hele NDV-cDNA-sekvensen klonet inn mellom T7-promoter og HDV-ribozymet i transkripsjons-plasmidet pOLTV5.

5 Kloning og ekspresjon av enkelte NDV-gener

DNA-fragmenter som inneholdt hver av NDV-LaSota-genene, ble generert ved hjelp av RT-PCR og klonet inn i pCIneo. Etter kloningen ble alle fragmenter sekvensiert ved bruk av primere som flankerte innføyelsene, og av genspesifikke primere. NP-gen: primer 386 (5'-GAGCAATCGAAGTCGTACGGGTAGAAG-GTG-3', nt 40-69) ble brukt for revers transkripsjon. Primer 365 (5'-GTGTGAATTCCGAGTGCGAGCCCGAAG-3', nt 77-94) og 892 (5'-TTGCATGCCTGCAGGTCAGTACCCCGAGTC-3', nt 1577-1593) ble brukt for PCR ved bruk av Pwo-DNA-polymerase. Den følgende PCR-profil (30 sykluser) ble brukt: 30 sek. ved 95°C, 40 sek. ved 65°C og 45 sek. ved 72°C. Det dannede DNA-fragment ble spaltet med EcoRI og klonet inn i pCIneo mellom EcoRI- og SmaI-stillingene. Ekspresjon av NP ble verifisert i et immunoperoksidase-enkeltsjiktassay (IPMA) som beskrevet av Peeters et al. (1992), ved bruk av monoklonalt antistoff 38 (Russell et al., 1983). P-gen: primer pRT1 (5'-CA-AAGAATTTCAGAAAAAAGTACGGGTAGAA-3', nt 1794-1814) ble brukt for revers transkripsjon. Primerne pRT1 og p2 (5'-GCAGTCTA-GATTAGCCATTCACTGCAAGGCGC-3', nt 3053-3071) ble brukt for PCR ved bruk av Pwo-DNA-polymerase. Den følgende PCR-profil (30 sykluser) ble brukt: 30 sek. ved 95°C, 40 sek. ved 65°C og 60 sek. ved 72°C. Det dannede DNA-fragment ble spaltet med EcoRI og XbaI og klonet inn i pCIneo mellom EcoRI- og XbaI-stillingene. Ekspresjon av P ble verifisert i et IPMA ved bruk av monoklonalt antistoff 688 (Russell et al., 1983).

M-gen: primeren 3UIT (5'-ACCAAACAGAGAATCCGTGAGTTACGA-3', nt 1-27) ble brukt for revers transkripsjon. Primerne NDV5M (5'-GGGTGCTAGCGGAGTGCCCCAATTGTGCCAA-3', nt 3268-3288) og NDV3M (5'-TCTCCCCGGGGCAGCTTATTTCTTAAAAGGAT-3', nt 4368-

4389) ble brukt for PCR ved bruk av Expand High Fidelity-settet. PCR bestod av 10 sykluser med 15 sek. ved 95°C, 30 sek. ved 55°C og 2 min. ved 68°C, fulgt av 15 sykluser hvor forlengelsesperioden ved 68°C ble hevet med 20 sek. pr.

5 syklus. Det dannede DNA-fragment ble behandlet med T4-DNA-polymerase for å danne butte ender, spaltet med NheI og klonet inn i pCIneo mellom NheI- og SmaI-stillingene. Ekspresjon av M-proteinet ble verifisert i et IPMA ved bruk av monoklonalt antistoff 424 (Russell et al., 1983).

10 F-gen: primeren 3UIT (se ovenfor) ble brukt for revers transkripsjon. Primerne NDV5F (5'-ACGGGCTAGCGATTCTGGATCCCG-GTTGG-3', nt 4508-4526) og NDV3F (5'-ACTACCCGGGAAACCTTCGTT-CCTCAT-3', nt 6212-6231) ble brukt for PCR ved bruk av Expand High Fidelity-settet ved bruk av betingelsene som
15 ble beskrevet ovenfor for M-genet. Det dannede DNA-fragment ble behandlet med T4-DNA-polymerase for å danne butte ender, spaltet med NheI og klonet inn i pCIneo mellom NheI- og SmaI-stillingene. Ekspresjon av F-proteinet ble verifisert i et IPMA ved bruk av monoklonalt antistoff 8E12A8C3
20 (ID-DLO, avdeling av Avian Virology).

HN-gen: primeren 3UIT ble brukt for revers transkripsjon. Primerne NDV5HN (5'-GTAGGCTAGCAAGAGAGGCCCGCCCTCAAT-3', nt 6335-6354) og NDV3HN (5'-CGAGCCCGGGCCGGCATTCGGTTTGATTCTTG-3', nt 8205-8227) ble brukt for PCR ved bruk av Expand High
25 Fidelity-settet ved bruk av betingelsene som ble beskrevet ovenfor for M-genet. Det dannede DNA-fragment ble behandlet med T4-DNA-polymerase for å danne butte ender, og etter spaltning med XmaI ble det klonet inn i pCIneo mellom den butt-gjorte (Klenow-DNA-polymerase) NheI-stilling og XmaI-
30 stillingen. Ekspresjon av HN-proteinet ble bekreftet i et IPMA ved bruk av monoklonalt antistoff 86 (Russell et al., 1983).

L-gen: L-genet ble isolert fra cDNA-klon pGEM-L7a (fig. 4A) ved spaltning med SacII og SalI. Før spaltning med SalI ble
35 SacII-stillingen gjort butt ved behandling med T4-DNA-poly-

merase. Det dannede fragment ble klonet inn i pCIneo mellom den butt-gjorte (Klenow-DNA-polymerase) NheI-stilling og SalI-stillingen. 5'-ikke-translatert parti mellom T7-promoter og ATG-startkodonet av L-genet inneholdt 2 ATG-kodoner utenfor rammen som eventuelt kunne forstyrre en riktig ekspresjon av L-proteinet. Derfor ble et nytt plasmid konstruert, hvor det første ATG manglet og hvor det andre ATG ble forandret til AAG ved PCR-mutagenese, som følger. Primerne 5LE(E) (5'-CAATGGAATTCAAGGCAAAACAGCTCAAGGTAAATAATACGGG-3', nt 8332-8374) og 3LE(B) (5'-GTGAATCTAGAATGCCGGATCCGTACGAA-TGC-3', nt 8847-8870) ble brukt i en PCR-reaksjon ved bruk av plasmidet pGEM-L7a (fig. 4) som sjablon. PCR ble utført ved bruk av Pwo-DNA-polymerase, og bestod av 30 sykluser med 30 sek. ved 94°C, 45 sek. ved 60°C og 60 sek. ved 72°C. Det dannede DNA-fragment ble spaltet med EcoRI og XbaI og klonet inn i pCIneo mellom EcoRI- og XbaI-stillingene, hvorved man dannet plasmidet pCIneoL(N). Deretter ble BsiWI-SalI-fragmentet fra pGEM-L7a, som inneholder resten av L-genet (nt 8852-15046), klonet inn i pCIneoL(N) mellom BsiWI- og SalI-stillingene, hvorved man genererte plasmidet pCIneoL(c). Fordi antistoffer mot L-proteinet ikke er tilgjengelig, kunne man ikke kontrollere ekspresjonen av L ved immunokjemi.

Innføring av en genetisk markør i F-genet

For å utvetydig vise at smittende virus kan genereres fra klonet fullengdet cDNA, ble en genetisk markør innført i F-genet ved hjelp av PCR-mutagenese. Med denne hensikt ble F-genet klonet ved bruk av to overlappende PCR-fragmenter. Det første PCR-fragment ble generert ved bruk av primerne NDV5F (se ovenfor) og primer F5R (5'-AAAGCGCCGCTGTCTCC-TCCCTCCAGATGTAGTCAC-3', nt 4859-4894). Residuene som vises med fet skrift, er endringer som ble innført i primeren for å forandre aminosyresekvensen av den proteolytiske spaltningstillingen mellom F1 og F2 fra stillingen som foreligger i NDV-LaSota-stammen (GGRQGR | L) til konsensus spaltningsstillingen for virulente NDV-stammer (GRRQRR | F). Det an-

dre PCR-fragment ble generert ved bruk av primerne F3F (5'-GGAGGAGACAGCGGCGCTTTATAGGCGCCATTATTGG-3', nt 4875-4911) og IV09 (5'-CTCTGTCGACACAGACTACCAGAACTTTCAC-3', nt 6246-6266). PCR ble utført med Pwo-DNA-polymerase, og bestod av 25 syk-

5 luser med 15 sek. ved 94°C, 30 sek. ved 55°C og 2 min. ved 72°C. De to overlappende PCR-fragmenter (overlappingen vises med kursive bokstaver i primersekvensen) ble føyd sammen i en andre PCR ved bruk av primerne NDV5F og IV09 og ved bruk av de samme PCR-betingelser. Det dannede fragment,

10 som inneholder hele ORF av F-genet og som koder for en virulent konsensspaltningsstilling, ble spaltet med NheI og SalI og klonet inn i pCIneo mellom NheI- og SalI-stillingene, hvilket gav pCIneoF^{wt}. StuI-NotI-fragmentet (nt 4646-4952) fra pCIneoF^{wt} ble brukt for å erstatte det tilsvarende fragment i plasmidet p535-S, som var blitt konstruert ved å innføre ClaI-ScaI (nt 3521-10311) fra pGEM-B i p535-DI mellom ClaI- og ScaI-stillingene (se fig. 4C). Det dannede plasmid ble benevnt p535-S[F^{wt}c]. Et PCR-fragment som inneholdt Cm-resistensgenet fra pACYC184 (se ovenfor), ble

20 klonet som et XbaI-fragment inn i den ensartede XbaI-stilling (posisjon 6172 i NDV-sekvensen) av plasmid p535-S[F^{wt}c], hvilket gav plasmidet p535-S[F^{wt}c]Cm. Deretter ble det Cm-merkede ApaI-SpeI-fragment (nt 2285-8094) av dette plasmid brukt til å erstatte det tilsvarende fragment

25 av fullengdet cDNA-klon pNDFL+. Til slutt ble Cm-genet fjernet fra dette plasmid ved spaltning med XbaI fulgt av resirkulasjon ved bruk av T4-DNA-ligase. Det dannede plasmid, som inneholder det genetisk merkede fullengdet NDV-cDNA, ble benevnt pNDFL+[F^{wt}].

30 Generering av stabilt transformerte cellelinjer som uttrykker enkelte NDV-gener

Plasmidene pCIneoNP, pCIneoP, pCIneoM, pCIneoF, pCIneoF^{wt} og pCIneoHN ble brukt for å generere stabilt transformerte cellelinjer som uttrykker disse proteiner hver for seg. Da-

35 gen før transfeksjonen ble CER-celler podet i 6 cm kultur-skåler og inkubert over natten for å gi en konfluens på 60-

80%. Cellene ble transfisert med 2 µg plasmid-DNA ved bruk av 12 µl LipofectAmine og OptiMem i det vesentlige som beskrevet av leverandøren (GibcoBRL/Life Technologies). Etter 48 timer ble cellene trypsinbehandlet, og fortynninger ble podet i 10 cm kulturskåler i medium som inneholdt 500 µg/ml G418 (Boehringer Mannheim). Hver 3. dag ble mediet erstattet med ferskt medium som inneholdt stigende (i trinn på 100 µg/ml) mengder av G418, inntil man nådde en konsentrasjon på 800 µg/ml. Cellene ble holdt i medium som inneholdt 800 µg/ml G418, og tre uker etter transfeksjonen, ble enkelte kolonier valgt og overført til 96-brønners kulturskåler. De klonede cellelinjer ble undersøkt for ekspresjon av det aktuelle NDV-gen ved bruk av et IPMA som beskrevet ovenfor for forbigående ekspresjonsundersøkelser.

Cellelinjer med egenekspresjon av NP, P, M eller F kunne identifiseres og isoleres. Vi klarte imidlertid ikke å generere cellelinjer som uttrykte HN-protein. Kanskje en iboende ekspresjon av HN er toksisk for cellene.

Generering av stabilt transformerte cellelinjer som uttrykker T7-RNA-polymerase

Genet som koder for T7-RNA-polymerase, ble isolert fra plasmidet pRT7NT (René van Gennip, ID-DLO, Department of Mammalian Virology) ved spaltning med EcoRI og SalI. Det dannede fragment inneholder T7-RNA-polymerasegen plassert bak bakulovirus-pl0-promoter. DNA-fragmentet ble klonet inn i plasmidet pCIneo0 mellom EcoRI- og SalI-stillingene, hvorved man genererte plasmidet pCIneo107. Plasmidet pCIneo0 mangler T7-promoter, og ble avledet fra pCIneo ved spaltning med NheI fulgt av en delvis spaltning med ScaI, fylling av de klebrige ender med Klenow-DNA-polymerase og resirkularisasjon ved bruk av T4-DNA-ligase. Baculovirussekvensene ble fjernet fra pCIneo107 ved spaltning med EcoRI og PacI, fulgt av T4-DNA-polymerasebehandling for å generere butte ender, og resirkularisasjon. Det dannede plasmid ble benevnt pCIneo007. Ekspresjon av T7-RNA-polymerase

rase ble verifisert ved kotransfeksjon av celler med pCI-neo007 og pPRh01. Det sistnevnte plasmid inneholder E2-protein av klassisk svinefebervirus klonet bak en T7-promoter og inneholdende en intern ribosominntredenstilling (René van Gennip, personlig meddelelse). Ekspresjon av E2 ble bestemt i et IPMA ved bruk av monoklonalt antistoff V4 (Wensvoort et al., 1986). Stabilt transformerte CER-cellelinjer som uttrykker T7-RNA-polymerase, ble generert og isolert som beskrevet ovenfor, unntatt at man brukte 10 cm kulturskåler og at cellene ble transfisert med 5 µg pCI-neo007-DNA og 25 µl LipofectAmine. For å undersøke enkelte cellelinjers ekspresjon av T7-RNA-polymerase, ble de transfisert med plasmidet pPRh01, og ekspresjonen av E2 (som er avhengig av T7-RNA-polymerase) ble bestemt i et IPMA ved bruk av monoklonalt antistoff V4. Flere cellelinjer som uttrykte T7-RNA-polymerase, ble identifisert. Én cellelinje, som man nevnte CER-C9, ble brukt for påfølgende eksperimenter.

Kloning og ekspresjon av HN-gener og hybrid-HN-gener

Primeren 3UIT ble brukt for å syntetisere enkeltkjedet cDNA av NDV og fjærfe-paramyxovirus-serotype 2 og 4 (APMV2 og APMV4) som beskrevet ovenfor. Alle påfølgende PCR-reaksjoner ble utført ved bruk av 25 sykluser med 15 sek. ved 94°C, 30 sek. ved 55°C og 2 min. ved 72°C.

Hele det kodende parti av HN-genet av APMV2 ble isolert ved hjelp av PCR ved bruk av primerne IV03 (5'-GGGGGAATTCCCCAT-TCAATGAAGGGTCTAC-3') og IV05 (5'-GATCCCCGGGTCTTAAACCAGGCTT-CGCAATG-3'), som ble avledet fra sekvensen av HN-genet av APMV2 (GenBank-tilgangsnummer D14030). Hele det kodende parti av HN-genet av APMV4 ble isolert ved PCR ved bruk av primerne IV06 (5'-GGGGGAATTCTGGTAGGGTGGGGAAGGTAGC-3') og IV08 (5'-ATTGCCCGGGGGTAACTAATCAGGATCTCAG-3') som var avledet fra sekvensen av HN-genet av APMV4 (GenBank-tilgangsnummer D14031). De dannede PCR-fragmenter ble spaltet (enten direkte eller etter delkloning inn i pGEM-T) med EcoRI

og XmaI og klonet inn i pCIneo mellom EcoRI- og XmaI-stillingene. De dannede plasmider ble benevnt henholdsvis pCIneoHN2 og pCIneoHN4.

Hybrider mellom HN-genet av NDV-stammen LaSota og HN-genene av APMV2 og -4 ble konstruert ved hjelp av overlappings-PCR som følger. Det N-terminale parti (aa 1-141) av HN-genet fra NDV-stammen LaSota ble amplifisert med Pwo-DNA-polymerase ved bruk av primerne IV01B (5'-GTAGGAATTCAAGAGAGGCCGC-CCCTCAAT-3', nt 6325-6354) og IV10 (5'-AATGAGTTCTTTGCCTATC-CCCC-3', nt 6811-6834). Det C-terminale parti av HN-genet av APMV2 (aa 142-580) ble amplifisert med Pwo-DNA-polymerase ved bruk av primerne IV11B (5'-GGGGGGATAGGCAAAGAACTCA-TTCAAGGAGATGCATCTGCAGGC-3') og IV05. De dannede PCR-fragmenter ble føyd sammen i en overlappings-PCR (overlappingen vises med kursiv) ved bruk av primerne IV01B og IV05 og ved bruk av Expand High Fidelity-enzymblandingen. Det dannede PCR-fragment ble spaltet (enten direkte eller etter delkloning inn i pGEM-T) med EcoRI og XmaI og klonet inn i pCIneo mellom EcoRI- og XmaI-stillingene. Det dannede plasmid, som inneholder et hybrid-HN-gen som består av 1-141 av NDV og aa 142-580 av APMV2, ble benevnt pCIneoHN1/2¹⁴¹.

Det C-terminale parti av HN-genet av APMV4 (aa 143-569) ble amplifisert ved bruk av primerne IV14B (5'-GGGGGGATAGGCAAA-GAACTCATTGTAGATGCATCTGCAGGCCTAAATTTCC-3') og IV08. Dette fragment ble føyd til det N-terminale parti av HN-genet av NDV (se ovenfor) i en overlappings-PCR ved bruk av primerne IV01B og IV08. Det dannede PCR-fragment ble spaltet (enten direkte eller etter delkloning inn i pGEM-T) med EcoRI og XmaI og klonet inn i pCIneo mellom EcoRI- og XmaI-stillingene. Det dannede plasmid, som inneholder et hybrid-HN-gen som består av aa 1-141 av NDV og aa 143-569 av APMV4, ble benevnt pCIneoHN1/4¹⁴¹.

Analogt med de ovenfor viste konstruksjoner, ble hybride HN-gener konstruert som bestod av aa 1-143 av NDV og aa 144-580 av APMV2, eller aa 1-143 av NDV og aa 145-569 av

APMV4. For disse konstruksjoner ble PCR-fragmenter erholdt ved bruk av de følgende primerpar: NDV aa 1-143: primere IV01B og IV13 (5'-ATCTACAATGAGTTCTTTGCCTATC-3', nt 6816-6840); APMV2 aa 144-580: primer IV14B (5'-GGGGGGATAGGCAAA-
 5 GAACTCATTGTAGATGATGCATCTGCAGGCCTAAATTTCC-3') og IV05; APMV4 aa 145-569: primer IV15B (5'-GGGGGGATAGGCAAAGAACTCATTGTAGATCAAACAGCTGACTACACAGCAG-3') og IV08. PCR-fragmentene ble spaltet (enten direkte eller etter delkloning inn i pGEM-T) med EcoRI og XmaI og klonet inn i pCIneo mellom EcoRI- og
 10 XmaI-stillingene. De dannede plasmider ble benevnt henholdsvis pCIneo1/2¹⁴³ og pCIneo1/4¹⁴³. For å undersøke ekspressjonen av HN-proteinene, ble CER-celler eller QM5-celler infisert med FPV-T7 i 1 time ved en m.o.i. på 1, transfi-
 sert med plasmidene pCIneoHN, pCIneoHN2, pCIneoHN4, pCIneo-
 15 HN1/2¹⁴¹, pCIneoHN1/2¹⁴³, pCIneoHN1/4¹⁴³ og pCIneoHN1/4¹⁴³, og 24 timer etter transfeksjonen ble monosjiktene dekket med en 1% suspensjon av kylling-erytrocytter i PBS i 45 minutter ved romtemperatur. Deretter ble monosjiktene forsiktig vasket tre ganger med PBS, og adhesjonen av erytrocytter
 20 til transfiserte celler ble undersøkt mikroskopisk. For å undersøke induksjonen av cellefusjon etter koekspresjon av HN- og F-protein, ble CER-celler eller QM5-celler kotransfisert med pCIneoF^{wt} sammen med enten pCIneo-HN1, pCIneoHN2, pCIneoHN4, pCIneoHN1/2¹⁴¹, pCIneoHN1/4¹⁴¹, pCIneoHN1/2¹⁴³ el-
 25 ler pCIneoHN1/4¹⁴³. Etter inkubasjon i 2-3 dager, ble monosjiktene vasket med PBS, farget i 15 minutter med en Giemsa-oppløsning (1:30 fortynning i vann) og undersøkt mikroskopisk.

Kloning av hybrid-HN-gener i fullengdet genomisk NDV-cDNA

30 Et syntetisk bindeledd benevnt HN12 ble innført mellom NotI- og SpeI-stillingene av pGEM-T (Promega) ved bruk av oligonukleotidene HN12a (5'-GGCCGCATATTCTAGAGTTAACGACTTA-3') og HN12b (5'-CTAGTAAGTCGTTAACTCTAGAATATGC-3'). Et syntetisk bindeledd benevnt HN14 ble innført mellom NotI- og
 35 SpeI-stillingene av pGEM-T ved bruk av oligonukleotidene HN14a (5'-GGCCGCATATTCTAGAGTTAACGA-3') og HN14b (5'-CTAGTC-

GTAACTCTAGAATATGC-3'). De dannede plasmider ble benevnt henholdsvis pGEM-HN12 og pGEM-HN14. Disse plasmider ble spaltet med NotI og XbaI og brukt til å klonе NotI-SpeI-fragmentet (nt 3390-7488) fra plasmidet p535-S[F^{wt}c]Cm. De dannede plasmider ble benevnt henholdsvis pGEM-HN1/2NS og pGEM-HN1/4NS. HN-genene av disse plasmider ble erstattet med hybrid-HN-genene fra henholdsvis plasmid pCIneoHN1/2¹⁴³ og pCIneoHN1/4¹⁴³ (se avsnitt "Kloning og ekspresjon av HN-gener og hybride HN-gener"). Med denne hensikt ble pCIneoHN1/2¹⁴³ og pCIneoHN1/4¹⁴³ spaltet med NheI og SmaI, og de dannede fragmenter (som inneholdt hybrid HN1/2¹⁴³- og hybrid HN1/4¹⁴³-gen) ble klonet inn mellom NheI- og HpaI-stillingen av plasmidene pGEM-HN1/2NS og pGEM-HN1/4NS, hvorved man dannet henholdsvis pGEM+HN12 og pGEM+HN14. De sistnevnte plasmider ble brukt til å innføre de hybride HN-gener inn i fullengdet genomisk cDNA-klon av NDV. Med denne hensikt ble plasmidene pGEM+HN12 og pGEM+HN14 spaltet med NotI og SpeI, og fragmentet som inneholdt enten HN12- eller HN14-gen, ble brukt for å erstatte det tilsvarende fragment av pNDFL+, hvilket gav henholdsvis pNDFL+HN1/2¹⁴³-Cm og pNDFL+HN1/4¹⁴³-Cm. Cm-genet ble fjernet fra disse plasmider ved spaltning med XbaI, fulgt av resirkularisasjon ved bruk av T4-DNA-ligase. For å oppfylle "rule-of-six", ble et bindeledd innført i den ensartede SpeI-stilling av disse plasmider ved bruk av selvkomplementære oligonukleotider. Bindeleddet H2 (5'-CTAGCGAGCGCTCG-3') ble innført i plasmid pNDFL+HN1/2¹⁴³, og bindeledd H3 (5'-CTAGCGAGCWGCTCG-3') ble innført i pNDFL+HN1/4¹⁴³, hvilket gav henholdsvis plasmidet pNDFL+HN1/2¹⁴³(H2) og pNDFL+HN1/4¹⁴³(H3).

30 Eliminering av en spesifikk epitop i HN-proteinet av NDV-LaSota

En spesifikk epitop, nemlig aminosyrene 346-354 (PDEQDY-QIR), i HN-proteinet av NDV-LaSota som gjenkjennes av MAб 4D6 (Long et al., 1986; Meulemans et al., 1986), ble eliminert ved å erstatte denne sekvens med den tilsvarende sekvens av HN-proteinene av enten APMV-2 (NRTDIQQTII) eller

APMV-4 (PDPLQDQIL). Med denne hensikt ble plasmidet pCIneo-HN (se avsnitt "Kloning og ekspresjon av enkelte NDV-gener) brukt som sjablong for å danne overlappende PCR-fragmenter. For APMV-2-sekvensen ble det første PCR-fragment generert ved bruk av primerne IV01 (5'-GTAGACGCGTAAGAGAGGCCGCCCTCAAT-3') og primer 3HN2 (5'-GATAGTTTGCTGTATATCAGTCCGATTGCATGTGTCATTGTATCGCTTGTATATCAC-3'). Det andre PCR-fragment ble generert ved bruk av primerne 5HN2 (5'-AATCGGACTGATATACAGCAAACTATCATGGCCAAGTCTTCGTATAAGCCTGGAGCC-3') og NDV3-HN (5'-CGAGCCCGGGCCGGCATTCCGGTTTGATTCTTG-3'). De dannede fragmenter ble slått sammen og brukt som sjablone for et tredje PCR-fragment ved bruk av primerne IV01B (5'-GTAGGAATTCAAGAGAGGCCGCCCTCAAT-3') og primer NDV3-HN. For APMV-4-sekvensen ble det første PCR-fragment generert ved bruk av primerne IV01 og primer 3NH4 (5'-TAAGATCTGATCTTGCAGCGGGTCAGGGCATGTGTCATTGTATCGCTTGTATATCAC-3'). Det andre PCR-fragment ble generert ved bruk av primerne 5HN4 (5'-CCTGACCGCTGCAAGATCAGATCTTAATGGCCAAGTCTTCGTATAAGCCTGGAGCC-3') og NDV3-HN. De dannede fragmenter ble slått sammen og brukt som sjablong for et tredje PCR-fragment ved bruk av primerne IV01B og NDV3-HN. Primerne 3HN2/5HN2 og 3HN4/5HN4 er delvis komplementære, og inneholder den genetiske kod for henholdsvis HN2-sekvensen (NRTDIQQTI) og HN4-sekvensen (PDPLQDQIL). PCR-reaksjonene ble utført ved bruk av Expand Long Template-PCR-settet (Boehringer Mannheim). PCR bestod av 30 sykluser med 10 sek. ved 94°C, 30 sek. ved 58°C og 2 min. ved 68°C, fulgt av 1 syklus med 4 min. ved 68°C. PCR-fragmentene ble spaltet med EcoNI og Bsu36I og klonet inn mellom EcoNI- og Bsu36I-stillingene av pCIneoHN. De dannede plasmider ble benevnt henholdsvis pCIneoHN1(HN2e) og pCIneoHN1(HN4e). Forbigående ekspresjonsundersøkelser tydet på at de modifiserte HN-proteiner ble uttrykt riktig og transportert til celleflaten, ifølge bedømmelser av hemadsorpsjonsstudier ved bruk av kyllingerytrocytter. Videre reagerte Mab 6D4, som er rettet mot en lineær epitop av HN av NDV og som består av (eller i det minste omfatter) aminosyrene 346-354, ikke med de modifiserte HN-proteiner.

Plasmidene pCIneoHN1(HN2e) og pCIneoHN1(HN4e) ble spaltet med NarI og SpeI, og fragmentene som inneholdt de modifiserte HN-gener, ble klonet inn mellom NarI- og SpeI-stillingen av henholdsvis pGEM-HN1/2NS og pGEM-HN1/4NS. De dannede plasmider, benevnt pGEM-HN1(HN2e) og pGEM-HN1(HN4e), ble spaltet med NotI og SpeI og brukt til å erstatte NotI- og SpeI-fragmentet i pNDFL+. De dannede plasmider ble benevnt henholdsvis pNDFL-HN(HN2e)Cm og pNDFL-HN(HN4e)Cm. Cm-genet ble fjernet fra disse plasmider ved spaltning med XbaI fulgt av gjenligering. De dannede plasmider ble benevnt henholdsvis pNDFL-HN(HN2e) og pNDFL-HN(HN4e).

RESULTATER

Nukleotidsekvens av 3'- og 5'-terminal ende av genomet av NDV-stammen LaSota

Sekvensen av en tenkt 3'-ende av NDV-genomet er blitt publisert (Ishida et al., 1986), selv om denne stammet fra en annen NDV-stamme (D26) enn den som ble brukt her (LaSota). Yusoff et al. (1987) har publisert en sekvens av L-genet og et relativt stort ikke-kodende parti bak L-genet av NDV-stammen Beaudette C. Imidlertid, slikt det vises heri, omfattet denne sekvens ikke hele den terminale 5'-ende av det virale genom, hvilket gjør det umulig å generere smittende kopi-NDV. 3'- og 5'-terminale ender av genomet av negativ-kjede-RNA-viruser ivaretar en vesentlig funksjon ved replikasjon og transkripsjon (Lamb og Kolakofsky, 1996). Dermed er det for å generere et fullengdet NDV-cDNA som kan brukes for å generere smittende virus ved hjelp av revers genetikk (Conzelmann, 1996), absolutt nødvendig å innlemme de riktige 3'- og 5'-ender av det virale genom. Derfor bestemte vi den nøyaktige nukleotidsekvens av både 3'- og 5'-ende av genomisk RNA av NDV-stammen LaSota ved bruk av 3'- og 5'-RACE-prosedyrer (rask amplifikasjon av cDNA-ender). 5'-ende ble isolert ved hjelp av PCR etter ligering av en enkeltkjedet ankerprimer (ALG3) til enkeltkjedet cDNA som var blitt generert ved revers transkripsjon av 5'-ende av geno-

misk RNA. Ved bruk av en primer (ALG4) som er komplementær med ankerprimeren og en NDV-spesifikk primer, genererte man PCR-produkter som inneholdt 5'-ende.

For å klonе 3'-ende av NDV ble den enkeltkjededе ankerpri-
 5 mer ALG3 ligert med 3'-ende av viralt RNA ved bruk av T4-
 RNA-ligase og amplifisert ved PCR ved bruk av primeren ALG4
 og en NDV-spesifikk primer (metode I). Alternativt ble 3'-
 og 5'-ende av NDV-RNA ligert med hverandre ved bruk av T4-
 RNA-ligase, og det dannede sammenkjededе RNA ble brukt for
 10 RT-PCR ved bruk av NDV-spesifikke primere som flankerte li-
 geringspunktet (metode II). 3'- og 5'-RACE-produkter ble
 klonet inn i T-vektor pBluescriptII-TSK (Ichihara og Kuro-
 sawa, 1993) eller i pGEM4Z, og flere uavhengige kloner ble
 isolert og sekvensiert. Resultatene er satt sammen i tabell
 15 2. For å muliggjøre en direkte sammenligning av 3'- og 5'-
 terminal ende, vises sekvensene i form av DNA, og 3'-ende
 av den genomiske kjede representeres som 5'-ende av den an-
 tigenomiske kjede. På genomis RNA-nivå er sekvensen av 3'-
 ende 3'-UGGUUUUGUCUCUUAG, mens sekvensen av 5'-ende er UUUA-
 20 GAAACAAACCA-5'. Sekvensen av 3'-ende er nesten lik den pub-
 liserte 3'-terminale sekvens av NDV-stammen D26 (Ishida et
 al., 1986). Imidlertid viste sekvensen av 5'-ende at NDV-
 stammen LaSota inneholder 64 ytterligere nukleotider sam-
 menlignet med den publiserte sekvens av L-genet av NDV-
 25 stammen Beaudette C (Yusoff et al., 1987) (fig. 6).

Replikasjon av NDV-minigenomer ved hjelp av hjelpervirus

For å bestemme om 3'- og 5'-ende av NDV er funksjonelle ved
 replikasjon og transkripsjon, ble minigenomer konstruert
 som bestod av 3'-ende av NDV (nt 1-119), et reportergen som
 30 kodet for utsondret alkalifosfatase (SEAP), og 5'-ende av
 NDV (nt 14973-15186) (fig. 2). Disse minigenomer ble klonet
 i begge retninger i transkripsjonsvektoren pOLTV5, hvorved
 man genererte henholdsvis plasmidet pOLTV535 og pOLTV553
 (for detaljer om konstruksjonen, se "Materialer og meto-
 35 der"). Plasmidet pOLTV5 (fig. 1) inneholder T7-RNA-polyme-

rasepromoter fulgt av ensartede StuI- og SmaI-restriksjonsposisjoner, det autokatalytiske ribozym fra hepatitt delta-virus (HDV) og transkripsjonstermineringssignalet fra bakteriofagen T7 (Pattnaik et al., 1992). *In vivo*- eller *in vitro*-transkripsjon ved bruk av T7-RNA-polymerase av plasmidet pOLTV535 fører til antigenomisk RNA (eller [+]RNA), mens en transkripsjon av plasmidet pOLTV553 gir opphav til genomisk RNA (eller [-]-RNA) (fig. 5).

For å undersøke om minigenom-RNA'ene som genereres av plasmidene pOLTV535 og pOLTV553, kunne replikeres og uttrykkes ved bruk av NDV som hjelpervirus, brukte vi CER-celler som uttrykte T7-RNA-polymerase enten av seg selv (CER-C9-celler, se "Materialer og metoder") eller etter infeksjon med fjærfekopper rekombinant fpEFLT7pol (Britton et al., 1995; heretter benevnt FPV-T7) som uttrykker T7-RNA-polymerase. CER-C9-celler og FPV-T7-infiserte CER-celler ble transfisert med minigenomplasmidene pOLTV535 eller pOLTV553, og etter inkubasjon i 3 timer ved 37°C ble cellene enten infisert med NDV i 1 time, eller fikk forbli uinfiserte. Om-

trent 24 timer etter transfeksjonen tok man en prøve fra mediet og testet for SEAP-aktivitet. Resultatene viste at SEAP-ekspresjonen var meget høy i FPV-T7-infiserte celler som ble transfisert med pOLTV535. Dette er ikke overraskende, siden transkripsjon med T7-RNA-polymerase genererer antigenomisk [+]RNA som er bementlet med fjærfekopper-enzymmer og som virksomt translateres av vertcellen. I celler som er transfisert med pOLTV553, genererer en transkripsjon med T7-RNA-polymerase genomisk [-]-RNA, som må omdannes til [+]RNA ved hjelp av hjelpervirus for å kunne translateres til SEAP-protein (jfr. fig. 5). I ingen av tilfellene kunne man observere noen hevet SEAP-ekspresjon i NDV-infiserte celler sammenlignet med ikke-infiserte celler. Tvert imot, var SEAP-ekspresjonen i NDV-infiserte celler konsekvent ca. 2 ganger lavere enn i ikke-infiserte celler (resultater ikke vist). For pOLTV535-transfiserte celler kan dette forklares med det allerede meget høye nivå av SEAP-ekspresjonen som forårsakes av transkripter som er generert av T7-

RNA-polymerase. I pOLTV553-transfiserte celler derimot, hvor en virksam ekspresjon av SEAP er avhengig av det virale polymerasekompleks' omdannelse av genomisk [-]-RNA til antigenomisk [+] -RNA eller mRNA, hadde vi forventet en he-
 5 vet SEAP-ekspresjon etter NDV-infeksjonen.

Vi kunne tenke oss to grunner til at minigenomene ikke ble uttrykt og replikert av NDV. For det første tilsvarende størrelsen av minigenom-RNA'ene ikke den såkalte "rule-of-six" (Calain og Roux, 1993; Kolakofsky et al., 1998). Ifølge
 10 denne regel replikeres paramyxovirus-genomer kun virksomt hvis de har en lengde som kan deles med 6 nt. For det andre kan de to ekstra G-residuer som foreligger i 5'-ende av minigenom-RNA'ene, kanskje forstyrre en korrekt replikasjon og/eller transkripsjon ved hjelp av det virale polymerase-
 15 kompleks. For å finne ut om replikasjonen av genomene var avhengig av "rule-of-six", innførte vi en rekke korte selvkomplementære oligonukleotider som økte 1 nt i størrelse, i den ensartede ClaI-stilling i plasmidene pOLTV535 og pOLTV553 (fig. 2). De dannede plasmider (pOLTV535N0 til -N5
 20 og pOLTV553N0 til -N5) skiller seg i størrelse fra 1 til 6 nt, og derfor burde ett av dem generere et minigenom-RNA som oppfyller "rule-of-six". Plasmidene ble brukt til å transfisere CER-celler eller FPV-T7-infiserte CER-C9-celler som beskrevet ovenfor. Resultatene viste at kun plasmidene
 25 pOLTV535N3 og pOLTV553N3 førte til en forsterket SEAP-aktivitet etter NDV-infeksjon. Lengden av minigenom-RNA'ene som genereres fra disse plasimer med T7-RNA-polymerase, ble beregnet å være $6n+2$. Fordi det foreligger 2 ekstra G-residuer i 5'-ende av minigenom-RNA'ene, tyder disse resultater
 30 at bare størrelsen av RNA-sekvensen som ligger mellom den autentiske 3'- og 5'-ende av minigenom-RNA'ene, er relevant for "rule-of-six". Dette ble verifisert ved å konstruere minigenomplasmider hvor transkripsjonsstarten av T7-RNA-polymerase ble endret slik at det første nukleotid som ble
 35 innlemmet i RNA, var det første nukleotid av 3'- eller 5'-ende av NDV (se "Materialer og metoder"). Transfeksjon av disse plasmider viste at kun minigenom-RNA'er generert med

plasmidene pOLTV735N3 og pOLTV753N3 replikeres av hjelper-viruset (resultater ikke vist). Disse funn tyder igjen på at replikasjonen av NDV er strengt avhengig av "rule-of-six". Videre tyder disse funn på at nærværet av to ekstra
 5 G-residuer i 5'-ende av minigenom-RNA'ene ikke forstyrrer en korrekt replikasjon. Lignende resultater er blitt erholdt med minigenomplasmider (eller DI-plasmider) fra andre paramyxoviridae (Pattnaik et al., 1992; Harty og Palese, 1995).

10 Innpakking av NDV-minigenomer med hjelpervirus

For å bestemme om minigenom-RNA'er kunne innpakkes med NDV-hjelpervirus, ble mediet av de transfiserte celler overført til ferske monosjikt, og etter 1 times adsorpsjon ble monosjiktene vasket tre ganger med PBS og ytterligere inkubert
 15 i fullstendig medium. Etter 24 timers inkubasjon ble SEAP-aktiviteten i mediet målt. Resultatene viste at SEAP-aktivitet kun forelå i celler som var blitt behandlet med mediet fra celler som var blitt transfisert med minigenomplasmidet pOLTV553N3 (tabell 4). Dette funn tyder på at minigenom-RNA'ene kan pakkes inn i NDV-omhyllinger, og at
 20 disse partikler har evnen til å infisere celler. Videre viser disse resultater at innpakkingen er uavhengig av replikasjon, hvilket viser at kun RNA-molekyler som er kompleksert med virale NP-, P- og L-proteiner, pakkes inn i viruslignende partikler.
 25

Replikasjon av NDV-minigenomer med plasmider som uttrykker NP-, P- og L-protein

For å bestemme om minigenom-RNA'er også kunne replikeres med plasmider som koder for de vesentlige NP-, P- og L-proteiner, utførte vi kotransfeksjonseksperimenter i celler
 30 som var infisert med FPV-T7. Celler ble transfisert med en kombinasjon av plasmider omfattende minigenomplasmidet og henholdsvis plasmid pCIneoNP, -P og -L(c). Som negativkontroll ble pCIneoL(c), som koder for det vesentlige L-pro-

tein, erstattet med vektorplasmidet pCIneo. Resultatene (tabell 5) viser at plasmider som koder for NP, P og L, faktisk har evnen til å replisere minigenom-RNA'er. Resultatene viser også at på lignende måte som minigenomreplikasjonen med hjelpervirus, er også replikasjonen med NP-, P- og L-proteiner avhengig av "rule-of-six".

Nukleotidsekvens av det fullstendige genom av NDV-stammen LaSota

Sub-genomiske cDNA-fragmenter som strekker seg over hele NDV-genomet, ble konstruert ved hjelp av RT-PCR (fig. 4). For å holde antallet PCR-feil på et minimum, brukte man en korrekturlese-enzymblanding (Expand Long Template; Boehringer Mannheim) i kombinasjon med et begrenset antall PCR-sykluser (15 sykluser). Primeren 3UIT, som er komplementær med 3'-ende av NDV-RNA, ble brukt for revers transkripsjon, og genspesifikke primere ble brukt for PCR. For å identifisere mulige PCR-feil, ble tre uavhengige RT-reaksjoner utført og brukt for å generere tre uavhengige sett subgenomiske cDNA'er. cDNA'ene, som hadde varierende størrelse fra ca. 4 til 7 kb, ble klonet inn i pGEM-T. Nukleotidsekvensen av to sett cDNA'er ble bestemt ved bruk av primere som enten ble avledet fra publiserte NDV-sekvenser, eller av primere avledet fra NDV-sekvensen som ble avledet under foreliggende sekvensieringsprosjekt (tabell 1). Gjenværende tvetydigheter ble løst opp ved sekvensiering av de relevante partier av det tredje sett cDNA-kloner. Genomet av NDV-stammen LaSota består av 15186 nt (fig. 3), hvilket gjør det til det minste av alle paramyxovirusgenomer som hele sekvensen er blitt bestemt for til idag (Kolakofsky et al., 1998).

Konstruksjon av fullengdet NDV-cDNA-klon i transkripsjonsplasmidet pOLTV5

For å konstruere fullengdet cDNA-klon av NDV-stammen LaSota, ble overlappende cDNA-kloner som strakk seg over hele

NDV-genomet, føyd sammen i felles restriksjonsstillinger i henhold til strategien som vises på fig. 4. Hele NDV-cDNA ble satt sammen i minigenomplasmidet pOLTV535 (se ovenfor), som er avledet fra transkripsjonsplasmidet pOLTV5. Slik det fremgår av fig. 4B, var det siste trinn i sammenføyningen av fullstendig NDV-cDNA en kloning av et ca. 8,8 kb stort ClaI (nt 3521-12355) fragment fra pGEM-B inn i p535-DI som inneholdt NDV-sekvenser som flankerte ClaI-stillingen på hver side (dvs. henholdsvis nt 1-3521 og 12355-15186).

Dette trinn viste seg å være nokså vanskelig fordi vi gjentatte ganger feilet i å generere de riktige kloner. Derfor ble ClaI-fragmentet av pGEM-B merket med kloramfenikolresistens (Cm)-gen fra plasmidet pACYC184. ClaI-fragmentet som inneholdt Cm-genet, ble isolert og klonet inn i ClaI-stillingen av p535-DI, og transformanter ble valgt for resistens mot begge Cm. Fordi transformantene vokste dårlig, ble det antibiotiske utvalg redusert til 15 µg/ml Cm og 10 µg/ml Km, og inkubasjonstemperaturen ble nedsatt fra 37°C til 32°C. Til slutt ble Cm-genet fjernet fra dette plasmid ved spaltning med BsiWI fulgt av resirkularisasjon ved bruk av T4-DNA-ligase. Etter transformasjon av *E. coli*, ble celler som inneholdt det ønskede plasmid, identifisert fenotypisk ved testing for Km-resistens og Cm-følsomhet. Det dannede plasmid, som bestod av fullengdet NDV-cDNA klonet inn mellom SmaI- og StuI-stillingene av transkripsjonsplasmidet pOLTV5, ble benevnt pNDFL+.

Generering av smittende NDV fra full-lengdet cDNA

For å generere smittende NDV utelukkende fra klonet cDNA, ble plasmidet pNDFL+ brukt i kotransfeksjonseksperimenter med pCIneoNP, -P og -L(c) som beskrevet ovenfor for minigenomplasmidene. Transfeksjon av CER- og CEF-celler ble overvåket ved bruk av minigenomplasmidet pOLTV553N3 og ved å måle SEAP-ekspresjonen. Som negativkontroll ble pCIneoL(c) erstattet med pCIneo. Etter kotransfeksjonen ble cellene inkubert i 3-6 dager i medium som inneholdt 5% allantoinvæske. Tilsetningen av allantoinvæske er nødvendig

fordi CER- eller CEF-celler mangler de egnede proteaser som er nødvendig for å spalte F-proteinet av NDV-stammen La-Sota. Spaltning av F-proteinet er absolutt nødvendig for en spredning fra celle til celle og for generering av smittende virus. Etter 3 dagers inkubasjon utførte vi en immunologisk farging av de festede monosjikt ved bruk av et monoklonalt antistoff mot F-proteinet. Resultatene viste at celler som ble farget med antistoffet, kun forelå i monosjiktene som var blitt kotransfisert med pNDFL(+), pCI-neoNP, -P og -L(c). Disse resultater tyder på at genomreplikasjon og -ekspressjon forekom i disse celler. Ingen fargede celler ble observert når pCIneoL(c) ble erstattet med pCIneo i kotransfeksjonseksperimentene.

For å isolere smittende virus, ble supernatanten av transfiserte CEF-monosjikt injisert inn i allantoinhulrommet av embryonerte egg. Fire dager senere ble allantoinvæsken samlet, analysert i et hemagglutinasjonsassay og passert videre i egg. Resultatene viste at kun supernatanten av celler som var blitt transfisert med en kombinasjon av pNDFL+ og pCIneoNP, -P og -L(c), gav en positiv reaksjon i hemagglutinasjonsassayet. Allantoinvæske som viste en positiv hemagglutinasjonsreaksjon, ble deretter analysert i et hemagglutinasjonsinhibisjonsassay ved bruk av monoklonale antistoffer 7B7, 8C11, 5A1, 7D4 og 4D6 (Long et al., 1986), som kan brukes for å skjelne mellom forskjellige NDV-stammer. Resultatene av dette assay tydet på at NDV-stammen som ble isolert fra de podede egg, oppviste samme reaktivitet som den opprinnelige LaSota-stamme. Viruset som ble isolert fra de podede egg, ble benevnt NDLV for å skjelne det fra den opprinnelige LaSota-stamme.

Generering av genetisk modifisert NDV fra full-lengdet cDNA

For å utvetydig demonstrere at kotransfeksjonssystemet kunne brukes til å isolere smittende virus fra klonet full-lengdet NDV-cDNA, ble en genetisk markør innført i plasmidet pNDFL(+). Med denne hensikt ble aminosyresekvensen av

proteasespaltningsstillingen i Fo-proteinet endret fra sekvensen i LaSota-stammen (GGRQGR | L) til konsenssekvensen av virulente NDV-stammer (GRRQRR | F) ved hjelp av PCR-mutagenese (for detaljer, se "Materialer og metoder"). Det dannede plasmid, pNDFL+[F^{wt}], ble brukt for å generere virus ved bruk av det ovenfor beskrevne kotransfeksjonssystem. Smittende virus, benevnt NDFL[F^{wt}], ble isolert fra allantoinvæsken av embroynerte egg som var blitt podet med mediet av kotransfisererte CEF-celler. I en HI-test oppviste alle MAb'er, også 7D4, som er spesifikk for LaSota-stammen, den samme reaktivitet med det nylig genererte virus som med den opprinnelige LaSota-stamme. Nukleotidsekvensen av partiet som koder for proteasespaltningsstillingen av F-protein, ble bestemt ved hjelp av RT-PCR. Resultatene viste at nukleotidsekvensen inneholdt de nøyaktige nukleotidendringer som ble innført i den mutagene primer som ble brukt for å modifisere den opprinnelige LaSota-sekvens. Dette funn viser at viruset ble avledet fra plasmidet pNDFL+[F^{wt}], og demonstrerer at (genetisk modifisert) NDV kan genereres fullstendig fra klonet fullengdet NDV-cDNA.

Proteasespaltningsstillingen av Fo-protein av NDV er en bestemmende nøkkelfaktor for virulens

Det antas generelt at aminosyresekvensen av proteasespaltningsstillingen av Fo-proteinet er en nøkkelfaktor som bestemmer virulensen av forskjellige NDV-stammer. Genereringen av en genetisk modifisert LaSota-stamme hvor aminosyresekvensen av proteasespaltningsstillingen var endret fra en lentogen (ikke-virulent) til stillingen fra en velogen (virulent) NDV-stamme, gav en ensartet mulighet til å teste denne antakelse. Derfor bestemte vi den intracerebrale patogenisitetsindeks (ICPI) av det nylig genererte virus NDFL[F^{wt}] og sammenlignet den med indeksen for stammen NDFL og for den opprinnelige LaSota-stamme (klon E13-1). Resultatene viste at ICPI for stammen NDFL[F^{wt}] var 1,3, hvilket er langt over verdien for stammene NDFL (ICPI = 0,0) og klonen E13-1 (ICPI=0,3). Disse resultater viser at virulen-

sen av NDV, som ventet, til stor del bestemmes av aminosy-
resekvensen av proteasespaltningsstillingen av Fo-protei-
net.

Innføring av en serologisk markør

5 Innhyllings-glykoproteinene F og HN av NDV er de mest immu-
nogene proteiner av viruset. Etter infeksjon utløser både
F- og HN-protein en sterkt nøytraliserende antistoffre-
spons. Induksjonen av en slik nøytraliserende antistoff-
respons er grunnlaget for en fremgangsrik vaksinasjon med
10 ikke-virulente NDV-stammer (så som den omfattende brukte
LaSota-stamme). Imidlertid kan antistoffresponsen mot NDV-
vaksinestammer ikke skjelnes fra antistoffresponsen mot vi-
rulente NDV-feltstammer. Dermed kan infeksjoner med viru-
lent feltvirus ikke spores ved serologiske metoder. Denne
15 situasjon er uønsket, siden feltvirusinfeksjoner maskeres
av en vaksinasjon, og kliniske tegn som forårsakes av felt-
stammer, kan overses eller t.o.m. skyldes på vaksinen.
Fordi en fremgangsrik differensiering mellom vaksinasjon og
infeksjon er essensiell for en utrydding av NDV, satte vi i
20 gang med å utvikle genetisk modifiserte NDV-stammer som kan
brukes for vaksinasjon og som kan skjelnes serologisk fra
NDV-feltstammer (såkalte markørvaksiner). For å utvikle en
NDV-markørvaksine, må viruset modifiseres genetisk slik at
én eller flere immunodominante epitoper av ett av (hoved-)
25 antigenene enten slettes eller modifiseres. En sletting av
én eller flere deler av et essensielt protein kan føre til
et tap av dette proteins biologiske funksjon. Derfor valgte
vi å modifisere et av de immunodominante omhyllingsprotei-
ner av NDV slik at den biologiske funksjon av proteinet ble
30 bevart, mens antistoffrepertoaret mot det modifiserte pro-
tein skilte seg fra antistoffene mot det opprinnelige pro-
tein. Av grunner som skal oppgis i det følgende, valgte vi
for én utførelse av oppfinnelsen å modifisere HN-proteinet
av NDV. Infeksjon med NDV initieres ved en fusjon av viri-
35 onomhyllingen med plasmamembranen av vertcellen. For denne
prosess er både F-protein og HN-protein nødvendig. Det er

blitt vist at F- og HN-proteinet vekselvirker fysisk, og at denne vekselvirkning er nødvendig for en membranfusjon (Deng et al., 1995). Videre er det blitt vist at vekselvirkningen er typespesifikk, dvs. F- og HN-proteinet må stamme fra samme virus for å oppvise fusjonsaktivitet. Den vekselvirkende domene av HN-protein av NDV er blitt lokalisert til det såkalte stilk- eller stammeparti av proteinet, omfattende de første 92 aminosyreresiduer av ekto-domene av HN-proteinet (Deng et al., 1995). Hybride HN-proteiner som består av aa 1-141 fra NDV og aa 141-572 fra humant parainfluenzavirus type 3 (hPIV3) viste seg å bevare sin fusjonsaktivitet når de ble kouttrykt sammen med NDV-F-protein. Disse funn tyder på at genetisk modifiserte NDV-stammer som inneholder et hybrid HN-protein som består av stammepartiet fra NDV fulgt av det globulære hode av HN-protein fra en forskjellig fjærfe-paramyxovirus-serotype, kan være levedyktig. Videre ville slike stammer utløse en anti-HN-antistoffrespons som skiller seg fra responsen mot NDV. Fordi den nøytraliserende antistoffrespons mot F-protein er tilstrekkelig for å muliggjøre en virksam beskyttelse mot en utfordring med virusinfeksjon, tilfredsstillende slike genetisk modifiserte NDV-stammer de to vesentlige krav til en markørvaksine, dvs. beskyttelse mot sykdom og serologisk differensiering.

Hybride HN-gener ble konstruert som bestod av en fusjon av enten aa 1-141 fra NDV med aa 142-580 fra fjærfe-paramyxovirus type 2 (APMV2) (benevnt HN1/2¹⁴¹) eller aa 1-143 av NDV og aa 144-580 fra APMV2 (benevnt HN1/2¹⁴³). På lignende måte ble hybride HN-gener konstruert som bestod av enten aa 1-141 fra NDV og aa 143-569 fra APMV4 (benevnt HN1/4¹⁴¹) eller aa 1-143 fra NDV og aa 145-569 fra APMV4 (benevnt HN1/4¹⁴³). De hybride gener ble klonet inn i den eukaryotiske ekspresjonsvektor pCIneo og brukt i kotransfeksjons-eksperimenter med et plasmid som inneholdt NDV-F-protein. Med denne hensikt ble F-proteinet modifisert slik at aminosyresekvensen av den proteolytiske spaltningsstilling mellom F2 og F1 ble endret fra LaSota-sekvensen til hva som

foreligger i konsenssekvensen av virulente NDV-stammer (F^{wt} , se "Materialer og metoder"). Kotransfeksjonseksperimenter i CER-celler og QM5-celler tydet på at både HN1/2¹⁴¹ og HN1/2¹⁴³ samt HN1/4¹⁴¹ og HN1/4¹⁴³ induiserte cellefusjon
 5 når de ble kouttrykt med F^{wt} -protein. Disse resultater tydet på at kompleksene mellom hybride HN-proteiner og F-proteinet var biologisk aktive. De hybride HN-proteiner HN1/2¹⁴³ og HN1/4¹⁴³ ble brukt for å erstatte det opprinnelige HN-gen i full-lengdet cDNA-klon pNDFL+, hvilket gav
 10 pNDFL-HN1/2¹⁴³ og pNDFL-HN1/4¹⁴³. De to sistnevnte plasmider ble deretter brukt for å generere smittende virus ved bruk av kotransfeksjonssystemet som ble beskrevet ovenfor. Levedyktige rekombinante virus (benevnt NDFL-HN1/2¹⁴³ og NDFL-HN1/4¹⁴³) kunne isoleres fra allantoïnvæsken i embryonerte
 15 egg som var blitt podet med supernatanten fra transfiserte monosjikt.

Nærværet av det hybride HN-gen i hver av de to rekombinanter ble verifisert ved bruk av RT-PCR. Hemagglutinasjonsinhibisjonstester viste at monoklonale antistoffer og fler-
 20 verdige antiserer mot NDV ikke kunne inhibere agglutinasjonen av kyllingerytrocytter forårsaket av de rekombinante virus NDFL-HN1/2¹⁴³ og NDFL-HN1/4¹⁴³. Disse resultater tyder på at stammene NDFL-HN1/2¹⁴³ og NDFL-HN1/4¹⁴³ kan brukes som vaksiner som kan serologisk skjelnes fra klassiske NDV-
 25 vaksiner.

Ekspresjon av et heterologt protein fra rekombinant NDV

For å undersøke om fremmede gener kan innføres i NDV-genomet, konstruerte vi et rekombinant virus som bar SEAP-reportergenet. SEAP-genet var avledet fra plasmidet pOLTV535,
 30 og var blitt modifisert for å omfatte de typiske transkripsjonelle start- og stopp-bokser av NDV. Et DNA-fragment som inneholdt SEAP-genet fulgt av de transkripsjonelle stopp- og start-bokser, ble innført i XmnI-stillingen (nt 109) i plasmidet pNDFL+[F^{wt}]. Smittende virus, benevnt DNFL-AP,
 35 ble generert ved bruk av kotransfeksjonssystemet, og nærvæ-

ret av SEAP-genet ble verifisert ved hjelp av RT-PCR. Celler som var infisert med stammen DNFL-AP, uttrykte meget høye mengder SEAP-protein. Ved bruk av den spesifikke aktivitet av SEAP-proteinet, beregnet vi at x% av proteinene som ble uttrykt i celler som var infisert med NDFL-AP, bestod av SEAP-protein. Disse resultater viser at heterologe gener kan uttrykkes i meget høye mengder fra rekombinant NDV.

Generering av en NDV-delesjonsmutant på en trans-komplementerende cellelinje

For å oppheve ekspresjonen av M-proteinet av NDV, ble en stor del av M-genet slettet ved spaltning av pNDFL+[F^{wt}] med BsaAI (nt 3087) fulgt av en delvis spaltning med HindIII (nt 4252). Etter å ha fylt opp HindIII-enden med Klenow-DNA-polymerase, ble fragmentet resirkularisert ved bruk av T4-DNA-ligase og brukt til å transformere *E. coli*. Det dannede plasmid, benevnt pNDFL+[F^{wt}]dM, ble brukt til å generere virus ved hjelp av kotransfeksjonssystemet i trans-komplementerende CER-M-celler som uttrykte NDV-M-protein. Supernatanten fra transfiserde monosjikt ble passert tre ganger på CER-M-celler og analysert for nærvær av virus. Virus ble beholdt som vist ved at kultursupernatanten av den tredje passasje gav positive resultater i hemagglutinasjons (HA)- og hemagglutinasjonsinhibisjons (HI)-tester. Viruset ble benevnt NDFL-dM. Når NDFL-dM ble brukt for å infisere monosjiktet av CEF-celler, kunne viruset fortsatt spre seg ved transmisjon fra celle til celle, som vist i et IPMA ved bruk av et monoklonalt antistoff mot F-proteinet. Som forventet, kunne man ikke demonstrere noen ekspresjon av M-proteinet i et IPMA ved bruk av monoklonale antistoffer mot M-proteinet. Når supernatanten ble brukt for å infisere enten CEF-celler eller CER-M-celler, kunne vi ikke påvise nærvær av repliserende virus i disse monosjikt ved hjelp av IPMA. Dette funn tyder på at smittende virus ikke kunne genereres i ikke-komplementerende CEF-celler. Dette funn ble bekreftet ved observasjonen at poding av embryo-

nerte egg med supernatant fra infiserte CER-celler ikke førte til noen generering av avkom-virus ifølge HA- eller HI-tester.

Behovet for bedre NDV-vaksiner, og spesielt behovet for
5 NDV-markørvaksiner, beveget oss til å utvikle et reverst
genetikksystem som ville muliggjøre en genetisk modifika-
sjon av NDV. I foreliggende dokument beskriver vi genere-
ringen av smittende NDV utelukkende fra klonet full-lengdet
cDNA. Vi viser at smittsomheten av NDV kan endres dramatisk
10 ved å modifisere kun 3 nukleotider, som bestemmer spesifi-
siteten av F-proteinets proteasespaltningsstilling. I dette
tilfelle ble proteasespaltningsstillingen endret fra stil-
lingen i LaSota-stammen til stillingen i konsensspaltnings-
stillingen av virulente NDV-stammer. Ved å generere denne
15 genetisk modifiserte NDV-stamme leverer vi formelle bevis
på at spaltbarheten av F-proteinet er nøkkelfaktoren (men
ikke den eneste bestemmende faktor) for virulensen av NDV.
Ved bruk av den samme reverse genetikkfremgangsmåte kan
spaltningsstillingen modifiseres etter ønske til hvilken
20 som helst annen aminosyresekvens. Dette kan føre til gene-
reringen av en rekke NDV-stammer som oppviser et spektrum
av virulensnivåer.

in vivo

Slik det allerede ble nevnt ovenfor, er det blitt vist at
25 foruten spaltbarheten av F- og HN-proteinene, kan andre vi-
rale faktorer bidra til patogenisiteten. Endringer av tran-
skripsjonen og translasjonen kan modulere veksten og viru-
sets spredning fra celle til celle og/eller cytopatogenisi-
teten. Tilgjengeligheten av et smittende cDNA av NDV mulig-
30 gjør en systematisk modifikasjon av sekvenser som omfattes
innen transkripsjon og replikasjon. Dette kan føre til en
utvikling av nye NDV-vaksiner som oppviser en optimal immu-
nogenisitet til nærmeste ikke-eksisterende virulens.

Sikkerhet er én av de viktigste egenskaper av levende vaksiner. Imidlertid står for mange levende vaksiner, også NDV, immunogenisitet ofte i omvendt forhold til virulensen. Derfor er en ytterligere svekkelse av levende vaksiner uten
5 å tape immunogenisitet, én av de mest ønskede endringer som en genetisk modifikasjon kunne brukes til. I denne hensyn er det verdt å nevne at det er blitt vist at en eliminasjon av ekspresjonen av V-protein av Sendai-virus førte til en betydelig nedsatt *in vivo*-patogenisitet for mus (Kato et
10 al., 1997). På lignende måte som Sendai-virus, genererer NDV også et V-protein ved en mekanisme som er kjent som RNA-redigering (Steward et al., 1993). Det er forutsigbart at en eliminasjon av ekspresjonen av V-proteinet av NDV også kan føre til en svekket fenotype *in vivo*.

15 Foruten å endre virulensen av NDV, viser vi at det er mulig å modifisere den antigene sammensetning av NDV slik at det kan genereres stammer som kan skjelnes serologisk fra NDV-feltstammer. Disse såkalte markørvaksiner er en uvurderlig hjelp for å bedømme forekomsten av NDV i kommersielle flok-
20 ker rundt omkring i verden. Videre kan en anvendelse i stor skala av slike markørvaksiner til slutt føre til en fullstendig utrydding av NDV ved en prosess med intens testing og utsletting av infiserte flokker. I foreliggende dokument viser vi at fremmede gener kan innføres i genomet av NDV.

25 Disse fremmede gener kan uttrykkes i meget høye nivåer i infiserte celler. Dette viser at NDV kan brukes som vaksinevektor for ekspresjon av antigener fra andre (fjærfe-) patogener. Flere egenskaper gjør NDV til en ideell vaksinevektor for vaksinasjon mot respiratoriske eller intestinale
30 sykdommer: 1) NDV kan lett dyrkes til meget høye titere i embryonerte egg. 2) Massekultur av NDV i embryonerte egg er relativt billig. 3) NDV-vaksiner er relativt stabile og kan lett administreres ved masseapplikasjonsmetoder såsom tilsetning til drikkevann eller ved besprøytning eller aerosoldannelse. 4) Den naturlige infeksjonsrute av NDV er via
35 respirasjonstrakten og/eller mage-tarm-trakten, som også er de naturlige hovedruter for infeksjon med mange andre

fjærfe-patogener. 5) NDV kan indusere en lokal immunitet til tross for nærværet av sirkulerende moder-antistoff.

Til slutt viser vi at levedyktige NDV-delesjonsmutanter kan genereres ved bruk av trans-komplementerende cellelinjer. En NDV-delesjonsmutant ble generert som ikke har evnen til å uttrykke matriks-(M)-protein, som er innblandet i spiring av NDV ved den indre cellemembran. Vi viser at en fenotypisk komplementert NDV-stamme som ikke har evnen til å uttrykke M-proteinet, fortsatt har evnen til å infisere celler og spres ved hjelp av transmisjon fra celle til celle. Imidlertid har det mutante virus ikke evnen til å generere smittende avkom på ikke-komplementerende celler. Dette funn viser at fenotypisk komplementerte NDV-delesjonsmutanter kan brukes som sikre selvbegrensende vaksiner som ikke har evnen til å spres ut i miljøet. En slik ikke-overførbar vaksine kombinerer den viktigste fordel av levende vaksiner, nemlig effekt, med den viktigste fordel av dreperte vaksiner, nemlig sikkerhet.

Figurtekst

Figur 1.

Transkripsjonsvektor pOLTV5 er et derivat av transkripsjonsvektoren beskrevet av Pattnaik et al. (1992). Se tekst for detaljer ved konstruksjonen. Plasmidet inneholder den T7 DNA-avhengige RNA-polymerasepromoter (vist i uthevet skrift) fulgt av enestående StuI og SmaI restriksjonssteder og det autokatalytiske ribozym fra hepatittdelta-virus (HDV). DNA-fragmenter kan bli klonet mellom StuI- og SmaI-setene og kan bli transkribert enten in vitro eller in vivo ved å bruke T7 RNA-polymerase. Den 5'-ende av de resulterende transkripter inneholder to ekstra G-residuer som ikke blir kodet av innskuddet. Grunnet virkningen av ribosymet tilsvarer den 3'-ende av transkriptet nøyaktig det siste nukleotid av innskuddet.

Figur 2.

Struktur av de minigenome plasmider pOLTV535 (fig. 2A) og pOLTV553 (fig. 2B). De minigenome plasmider er basert på transkripsjonsplasmider pOLTV5 (se fig. 1) og inneholder
 5 det 3' området (nt 1-119) og det 5' området (nt 14970-15186) av NDV-stamme LaSota som flankerer genet som koder for utskilt alkalisk fosfat (SEAP). Transkripsjon av pOLTV535 ved T7 RNA-polymerase gir antigenomisk RNA (eller
 10 (+)-RNA) mens transkripsjonen av pOLTV553 gir genomisk RNA (eller (-)-RNA). Start (S) og slutt (E) boksene som er virale transkripsjonsinitierings og termineringssignaler er angitt. Startkodonene av SEAP-genet er understreket. Sekvensene for innsetningene (N0-N5) i ClaI-setet som danner minigenomplasmider som hver er forskjellige med 1 nt i
 15 lengde (pOLTV535N0-N5 og pOLTV553N0-N5) er også vist.

Figur 3

Nukleotidsekvens av genomet av NDV-stamme LaSota og avledet aminosyresekvens for NDV-genene. Sekvensen som er vist
 20 tilsvarende den antigenomiske kjede og er vist i 5' til 3' retning i form av ssDNA. Sekvensen som er vist i denne figur er den til konsensussekvensen som ble bestemt ved fullstendig å sekvensere to uavhengige sett av overlappende subgenomiske cDNA som strekker seg over hele NDV-genomet. Gjenværende uoverensstemmelser (sannsynligvis som et resultat av PCR-feil) ble løst ved å sekvensere relevante områder
 25 av et tredje uavhengig sett av kloner.

Sekvensen av den fulllengdede cDNA-klonen pNDFL+ som ble satt sammen fra overlappende sub-genomiske cDNA-kloner (se figur 4), er forskjellige fra den til konsensus NDV-sekvensen ved de følgende posisjoner (konsensussekvens mellom parenteser): nt 1755, G (A); nt 3766, A (G); nt 5109, G(A);
 30 nt 6999, T (C); nt 7056, G (A); nt 9337, G (A); nt 9486, A (T); nt 10195, T (C); nt 13075, A (G); Disse forskjeller resulterer i 3 aminosyreendringer (konsensussekvens mellom

parenteser): F-protein, R¹⁸⁹ (Q); HN-protein S²⁰⁰ (P) L-protein N³⁶⁹ (I).

Figur 4.

- (A) Total strategi benyttet for sammensetning av full-lengdet NDV cDNA fra subgenomiske overlappende cDNA-kloner. cDNA-materialet ble satt sammen i plasmid pOLTV535 som allerede inneholdt 3' og 5' ender av NDV-stamme LaSota (se fig. 2). Det resulterende plasmid, betegnet pNDFL+ ble benyttet for dannelsen av infeksjonsdyktige NDV.
- (B) Detaljert kloningsprosedyre for sammensetning av full-lengdet NDV cDNA fra subgenomiske overlappende cDNA-kloner. Cm betegner kloramfenikol-resistensgenet som temporært ble introdusert som en fenotypisk markør (se tekst for detaljer).
- (C) Detaljert kloningsprosedyre for fremstillingen av genetisk modifisert fulllengdet NDV cDNA. Modifikasjonen består av 3 nukleotidendringer som ble innført i F-genet og som resulterer i modifikasjonen av aminosyresekvensen av det proteolytiske spaltingssete hos F-proteinet (se tekst for detaljer).

Figur 5.

(A) pOLTV535-serien

- Transkripsjon ved hjelp av T7 RNA polymerase gir antigenomisk RNA (eller (+)-RNA) som direkte kan bli translatert til SEAP-protein av cellen. Etter infeksjon av celler med hjelpevirus (eller etter ko-transfeksjon av plasmider som koder for NP-, P-, og L) blir det antigenomiske RNA benyttet av det virale polymeraseskompleks for syntesen av genomisk RNA (eller (-)-RNA). Det genomiske RNA blir så benyttet av det virale polymerasekompleks for syntesen av både

mRNA (ved å bruke den spesifikke transkripsjonsstart [S] og ende [E] bokser) og antigenomisk RNA.

(B) pOLTV553-serien

Transkripsjon ved hjelp av T7 RNA-polymerase gir genomisk
 5 RNA (eller [-]-RNA) som ikke kan bli translatert til SEAP-
 proteinen. Etter infeksjon av celler med hjelpevirus (el-
 ler etter ko-transfeksjon av plasmider som koder for NP, P,
 og L) blir det genomiske RNA benyttet av det virale polyme-
 rasekompleks for syntesen av både mRNA (ved å bruke den
 10 spesifikke transkripsjonsstart [S] og ende [E] bokser) og
 antigenomisk RNA.

Figur 6

Sammenligning av nukleinsyresekvenser 5' terminale ender av
 NDV LaSota og andre paramyxovirus er gitt som sekvenssam-
 15 menligning av NDV og de fire medlemmer av *Rubulavirus*
 slekten, tre medlemmer av *Paramyxovirus* genus, og tre med-
 lemmer av *Morbillivirus* slekten. Sekvensene er presentert
 fra L-gen endeboksen til den 5' ende (3' - 5' cDNA).

NDV, Newcastle sykdomsvirus; hPIV2, human parainfluenzavi-
 20 rus 2; MuV, kusmavirus; SV5 og SV41, henholdsvis simmianvi-
 rus 5 og 41; SeV, sendaivirus; bPIV3 og hPIV3, henholdsvis
 bovin og human parainfluenzavirus; CDV, gnagergalskapvirus;
 MeV meslingvirus RPV, rinderpestvirus. Nukleotid
 (nt)sekvenser av de fullstendige genomer ble oppnådd som
 25 følger (tilgangsnummer): NDV(AF077761); hPIV2(X57559);
 MuV(AB000388); SV5(AF052755); SV41(X64275); bPIV3(D84095);
 hPIV3(Z11575); CDV(L13194); MeV(X16565); RPV(Z30697).

Referanser

- Alexander, D.J. (1993) Paramyxovirus infections. In
 5 Virus infections of birds. McFerran, J.B. and McNulty,
 M.S. (eds), pp 321-340, Elsevier Science Publishers
 B.V., Amsterdam.
- Antin, P.B and Ordahl, C.P. (1991) Isolation and
 characterization of an avian myogenic cell line. *Dev.*
 10 *Biol.* 143: 111-121.
- Baron, M.D. and Barrett, T. (1997) Rescue of rinderpest
 virus from cloned cDNA. *J. Virol.* 71: 1265-1271.
- Beach, J.R. (1944) The neutralization in vitro of avian
 pneumoencephalitis virus by Newcastle disease immune
 15 serum. *Science* 100: 361-362.
- Beard, C.W. and Hanson, R.P. (1984) Newcastle disease.
 In M.S. Hofstad et al. (eds) *Disease of Poultry*, 8th
 Ed., pp. 452-470. Iowa State University Press, Ames.
- Beaudette, F.R., Bivins, J.A. and Miller, B.R. (1949)
 20 Newcastle disease immunization with live virus. *Cornell*
Vet. 39: 302-334.
- Boursnell, M.E.G., Green, P.F., Samson, A.C.R.,
 Campbell, J.I.A., Deuter, A., Peters, R.W., Millar,
 N.S., Emmerson, P.T. and Binns, M.M. (1990) A
 25 recombinant fowlpox virus expressing the hemagglutinin-
 neuraminidase gene of Newcastle disease virus (NDV)
 protects chickens against challenge by NDV. *Virology*
 178: 297-300.
- Britton, P., Green, P., Kottier, S., Mawditt, K.L.,
 30 Penzes, Z., Cavanagh, D. and Skinner, M. (1996)
 Expression of bacteriophage T7 RNA polymerase in avian
 and mammalian cells by a recombinant fowlpox virus. *J.*
Gen. Virol. 77: 963-967.

- Calain, P. and Roux, L. (1993) The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J. Virol.* 67: 4822-4830.
- 5 Chambers, P., Millar, N.S., Bingham, R.W. and Emmerson, P.T. (1986) Molecular cloning of complementary DNA to Newcastle disease virus and nucleotide sequence analysis of the junction between the genes encoding the haemagglutinin-neuraminidase and the large protein. *J.*
- 10 *Gen. Virol.* 67: 475-486
- Chang, A.C.Y. and Cohen, S.N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* 134: 1141-1156.
- 15 Cho, B.R. (1982) Cytopathic effects and focus formation by reticuloendotheliosis viruses in a quail fibroblast cell line. *Avian Diseases* 27: 261
- Collins, P.L., Hil, M.G., Camargo, E., Grosfeld, H., Chanock, R.M. and Murphy, B.R. (1995) Production of
- 20 infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11563-11567.
- 25 Conzelmann, K.-K. (1996) Genetic manipulation of non-segmented negative-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 77: 381-389.
- Cowen, B.S. and Braune, M.O. (1988) The propagation of
- 30 avian viruses in a continuous cell line (QT35) of Japanese quail origin. *Avian Diseases* 32: 282-297.
- Deng, R., Wang, Z., Mirza, A.M. and Iorio, R.M. (1995) Localization of a domain on the paramyxovirus attachment protein required for the promotion of cellular fusion by

- its homologous fusion protein spike. *Virology* 209: 457-496.
- Doyle, T.M. (1927) A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter-passing virus. *J. Comp. Pathol. Ther.* 40: 144-169.
- Garcin, D., Pelet, T., Calain, P., Roux, L., Curran, J. and Kolakofsky, D. (1995) A highly recombinogenic system for the recovery of infectious Sendai paramyxovirus from cDNA: generation of a novel copy-back non-defective interfering virus. *EMBO J.* 14: 6087-6094.
- Garten, W., Berk, W., nagai, Y., Rott, R. and Klenk, H.-D. (1980) Mutational changes of the protease susceptibility of glycoprotein F of Newcastle disease virus: Effects on pathogenicity. *J. Gen. Virol.* 50: 135-147.
- Goldhaft, T.M. (1980) Historical note on the origin of the LaSota strain of Newcastle disease virus. *Avian Dis.* 24: 297-301.
- Gough, R.E. and Alexander, D.J. (1973) The speed of resistance to challenge induced in chickens vaccinated by different routes with a B1 strain of live NDV. *Vet. Rec.* 92: 563-564.
- Hanson, R.P. (1988) Heterogeneity within strains of Newcastle disease virus: key to survival. In D.J. Alexander (ed.), *Newcastle Disease*, pp. 113-130. Kluwer Academic Publ., Boston.
- Harty, R.N. and Palese, P. (1995) Mutations within noncoding terminal sequences of model RNA's of Sendai virus: Influence on reporter gene expression. *J. Virol.* 69: 5128-5131.
- Heckert, R.A., Riva, J., Cook, S., McMillen, J. and Schwartz, R.D. (1996) Onset of protective immunity in chicks after vaccination with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing Newcastle disease virus

- fusion and hemagglutinin-neuraminidase antigens.
Avian Dis. 40: 770-777.
- Heuschele, W.P. and Easterday, B.C. (1970) Local
 immunity and persistence of virus in the tracheas of
 5 chickens following infection with Newcastle disease
 virus. II. Immunofluorescent and histopathological
 studies. *J. Inf. Dis.* 121: 497-504.
- Hitchner, S.B. and Johnson, E.P. (1948) A virus of low
 10 virulence for immunizing fowls against Newcastle disease
 (avian pneumoencephalitis). *Vet. Med.* 43: 525-530.
- Hoffman, M.A. and Banerjee, A.K. (1997) An infectious
 clone of human parainfluenza virus type 3. *J. Virol.* 71:
 4272-4277.
- 15 Hofstad, M.S. (1953) Immunization of chickens against
 newcastle disease by formalin-inactivated vaccine. *Am.*
J. Vet. Res. 14: 586-589.
- Ichihara, Y., and Kurosawa, Y. (1993) Construction of
 new T vectors for direct cloning of PCR products. *Gene*
 20 130: 153-154.
- Ishida, N., Taira, H., Omata, T., Mizumoto, K., Hattori,
 S., Iwasaki, K. and Kawakita, M. (1986) Sequence of 2617
 nucleotides from the 3' end of Newcastle disease virus
 genome RNA and the predicted amino acid sequence of the
 25 viral NP protein. *Nucl. Acids Res.* 14: 6551-6564.
- Kaleta, E.F. and Baldauf, C. (1988) Newcastle Disease in
 free-living and pet birds. In D.J. Alexander (ed.),
 Newcastle Disease, pp. 197-246. Kluwer Academic Publ.,
 Boston.
- 30 Kant, A., Koch, G., van Roozelaar, D.J., balk, F. and
 ter Huurne, A. (1997) Differentiation of virulent and
 non-virulent strains of Newcastle disease virus within
 24 hours by polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 26:
 837-849.
- 35 Kolakofsky, D., Pelet, T., Garcin, D., Hausmann, S.,
 Curran, J. and Roux, L. (1998) Paramyxovirus RNA

- synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *J. Virol.* 72: 891-899.
- Kraneveld, F.C. (1926) A poultry disease in the Dutch East Indies. *Ned. Indisch Bl. Diergeneesk.* 38: 448-450.
- 5 Lamb, R.A. and Lolakofsky, D. (1996) *Paramyxoviridae: the viruses and their replication.* in: *Fundamental Virology* (Fields et al., eds), Chapter 20, p577-604, Lipincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- 10 Lawson, N.D., Stillman, E.A., Whitt, M.A. and Rose, J.K. (1995) Recombinant vesicular stomatitis virus from DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4477-4481.
- Long, L., Portetelle, D, Ghysdael, J., Gonze, M., Burny, A. and Meulemans, G. (1986) Monoclonal antibodies to
- 15 haemagglutinin-neuraminidase and fusion glycoproteins of Newcastle disease virus: relationship between glycosylation and reactivity. *J. Virol.* 57: 1198-1202.
- Madansky, C.H. and Bratt, M.A. (1978) Noncytopathic mutants of Newcastle disease virus. *J. Virol.* 26: 724-729.
- 20 Madansky, C.H. and Bratt, M.A. (1981a) Noncytopathic mutants of Newcastle disease virus are defective in virus-specific RNA synthesis. *J. Virol.* 37: 317-327.
- Madansky, C.H. and Bratt, M.A. (1981b) Relationships among virus spread, cytopathogenicity, and virulence as
- 25 revealed by the noncytopathic mutants of Newcastle disease virus. *J. Virol.* 40: 691-702.
- Meulemans, G., Gonze, M., Carlier, M.C., Petit, P., Burny, A. and Long, L. (1986) Protective effects of HN and F glycoprotein-specific monoclonal antibodies on
- 30 experimental Newcastle disease. *Avian Pathol.* 15: 761-768.
- Millar, N.S., Chambers, P. and Emmerson, P.T. (1988) Nucleotide sequence of the fusion and haemagglutinin-neuraminidase gene of Newcastle disease virus, strain
- 35 Ulster: Molecular basis for variations in pathogenicity between strains. *J. Gen. Virol.* 69: 613-620.

- Morgan, R.W., Gelb Jr., J., Schreurs, C.S., Lütticken, D., Rosenberger, J.K. and Sondermeijer, P. (1992) Protection of chickens from Newcastle and Marek's diseases with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing the Newcastle disease virus fusion protein. *Avian Dis.* 36: 858-870.
- Morgan, R.W., Gelb Jr., J., Pope, C.R. and Sondermeijer, P. (1993) Efficacy in chickens of a herpesvirus of turkeys recombinant vaccine containing the fusion gene of Newcastle disease virus: onset of protection and effect of maternal antibodies.
- Moscovici, C., Moscovici, M.G., Jimenez, H., Lai, M.M., Haymann, M.J. and Vogt, P.K. (1977) Continuous tissue culture cell lines derived from chemically induced tumors of Japanese quail. *Cell* 11: 95-103.
- Pattnaik, A.K., Ball, L.A., LeGrone, A.W. and Wertz, G.W. (1992) Infectious defective interfering particles of VSV from transcripts of a cDNA clone. *Cell* 69: 1011-1020.
- Peeples, M.E. (1988) Newcastle disease virus replication. In D.J. Alexander (ed.), *Newcastle Disease*, pp. 45-78. Kluwer Academic Publ., Boston.
- Peeters, B., N. de Wind, M. Hooisma, F. Wagenaar, A. Gielkens, and R. Moormann. (1992) Pseudorabies virus envelope glycoproteins gp50 and gII are essential for virus penetration, but only gII is involved in membrane fusion. *J. Virol.* 66: 894-905.
- Radecke, F., Spielhofer, P., Schneider, H., Kaelin, K., Huber, M., Dötsch, C., Christiansen, G. and Billeter, M.A. (1995) Rescue of measles virus from cloned DNA. *EMBO J.* 14: 5773-5784.
- Rott, R. and Klenk, H.-D. (1988) Molecular basis of infectivity and pathogenicity of Newcastle disease virus. In D.J. Alexander (ed.), *Newcastle Disease*, pp. 98-112. Kluwer Academic Publ., Boston.

- Russell, P.H., Griffiths, P.C., Goswami, K.K.A., Alexander, D.J., Cannon, M.J. and Russell, W.C. (1983) The characterization of monoclonal antibodies to Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.* 64: 2069-2072.
- 5 Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY.
- Schneider, H., Spielhofer, P., Kaelin, K., Dötsch, C., Radecke, F., Sutter, G. and Billeter, M.A. (1997) Rescue of measles virus using a replication-deficient vaccinia-T7 vector. *J. Virol. meth.* 64: 57-64.
- 10 Schnell, M.J., Mebatsion, T. and Conzelmann, K.-K. (1994) Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J.* 13: 4195-4203.
- 15 Schütze, H., Enzmann, P.-J., Kuchling, R., Mundt., E., Niemann, H. and Mettenleiter, T.C. (1995) Complete genomic sequence of the fish rhabdovirus infectious haematopoietic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* 76: 2519-2527.
- 20 Smith, A.L., Tignor, G.H., Mifune, K., and Motohashi, T. (1977) Isolation and assay of rabies serogroup viruses in CER cells. *Intervirology* 8: 92-99.
- Spradbrow, P.B. (1988) Geographical distribution. In D.J. Alexander (ed.), *Newcastle Disease*, pp. 247-255. Kluwer Academic Publ., Boston.
- 25 Staüber, N., Brechtbühl, K., Bruckner, L. and Hofmann, M.A. (1995) Detection of Newcastle disease virus in poultry vaccines using the polymerase chain reaction and direct sequencing of amplified DNA. *Vaccine* 13: 360-364
- 30 Steward, M., Vipond, I.B., Millar, N.S. and Emmerson, P.T. (1993) RNA editing in Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.* 74: 2539-2547.
- Taylor, J., Edbauer, C., Rey-Senelongue, A., Bouquet, J., Norton, E., Goebel, S., Desmettre, P. and Paoletti, E. (1990) Newcastle disease virus fusion protein expressed

- in a fowlpox virus recombinant confers protection in chickens. *J. Virol.* 64: 1441-1450.
- Tessier, D.C., Brousseau, R., and Vernet, T. (1986) Ligation of single-stranded oligodeoxyribonucleotides by T4 RNA ligase. *Anal. Biochem.* 158: 171-178.
- Vieira, J., and Messing, J. (1991) New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins. *Gene* 100: 189-194.
- 10 Vindevogel, H. and Duchatel, J.P. (1988) Panzootic Newcastle disease virus in pigeons. In D.J. Alexander (ed.), *Newcastle Disease*, pp. 184-196. Kluwer Academic Publ., Boston.
- Whelan, S.P.J., Ball, L.A., Barr, J.N. and Wertz, G.T.W. 15 (1995) Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8388-8392.
- Wensvoort, G., Terpstra, C., Bonstra, J., Bloemraad, M. and Van Zaane, D. (1986) Production of monoclonal 20 antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. *Vet. Microbiol.* 12: 101-108.
- Yusoff, K., Millar, N.S., Chambers, P., and Emmerson, P.T. (1987) Nucleotide sequence analysis of the L gene of Newcastle disease virus: homologies with Sendai and vesicular 25 stomatitis viruses. *Nucl. Acids Res.* 15: 3961-3976.

Tabell 1

3'UIT	ACCAAACAGAGAATCCGTGAGTTA	1-24
P368+	GTGATGAGGAACCATGTTGC	368-387
P800+	GTCCGCATCTTCTTGGTTAG	800-819
P1201+	GAGACTTGGAGTAGAGTACG	1201-1220
P1279+	AGCAGCAATGAAGGGCCTGG	1279-1298
P1356+	AAATCGGAGTCCTCACTGGG	1356-1375
P1683+	CTCTATATGACCACACCCTC	1664-1683
PRT1	CAAAGAATTCAGAAAAAAGTACGG GTAGAAG	1785-1814
P2357+	GGAAACAGTCAGGAAAGACC	2358-2377
P2599+	TAAGTAAAGTTGACTATCAG	2599-2618
P2852+	GGCACTTAATAAACTTTTCGC	2852-2871
P3496+	GAATGAAGAAGCCACTGTCTG	3496-3515
P3587+	CGGAGATCTTGTTGAGTTGG	3589-3608
P4267+	CATTATCCAAGCAGGTACCC	4270-4299
NDV5-F	ACGGGCTAGCGATTCTGGATCCCG GTTGG	4498-4526
P4731+(LS)	AAGCTCCTCCCGAATCTGCC	4733-4752
P4958+	AGCTCTGATACAAGCCAAAC	4960-4979
P5266+(LS)	CTGGTGGGAATATGGATTAC	5267-5286
P5591+(LS)	AGTAACGTTCCCTATGTCCC	5593-5612
P5616+	GTATTTATTCTTGCTTGAGC	5616-5635
P6000	AATACCCTTGATCAGATGAGAGCC	6166-6190
NDV5-HN	GTAGGCTAGCAAGAGAGGCCGCC CTCAAT	6325-6354
P6693+(L)	CATTGTAAAAAAGTGAAGACC	6695-6714
P7110+(L)	ATCGGAAGTCTTGAGTGTG	7112-7131
P7501+(L)	TGGTGGGAAACGCATCCAGC	7503-7522
P7900+(LS)	AAGACTTAATCCTACGTCTG	7902-7921
P8590+	AACTCGGAAGGGCAGTACAC	8592-8611
L9000	TTTGTCACTCCTGAACTTGTCATT	9008-9031
P9359+	CAATGATATAGCAGAATCCG	9361-9380

Tabell 1, forts.

P9371+	GCAGAATCCGTGACTCATGC	9371-9411
P9390+	ATAGCTACTGTATTCTCTGG	9392-9411
P9686+	TCACACGATATCATGTTGAG	9686-9705
P9799+	CACACCCTAACGATAATTGG	9801-9820
P10198+	ATAAGAAACGTATCACTGAC	10200- 10219
P10601+	TTGTCGCGTTGCCTGTATGG	10603- 10622
P11006+	GCAGACATACTTTGACTCTG	11008- 11027
P11393+	TCCCTTATTGTCTGGAGTGC	11395- 11414
P11798+	TGATACGATAGAACTCGTAG	11800- 11819
L12000	CATATGTCGCCACATGTGAAGGCT	12008- 12031
P12373+	CAACCAGGACATATGATGAG	12375- 12394
P12796+	TCGACTGTTCTTACCAACTC	12798- 12817
P12978+	CACACCAACTTGCAGATACG	12978- 12997
P13236+	GAGTATCTACTGTCTGGATGC	13238- 13257
P13601+	ATACTTGTTTCAGAGGAATAG	13603- 13622
P13943+	GACCTGACCTCAGATAAAGC	13946- 13965
P14002+	TATCATTGCTGCATTGTGAC	14004- 14023

Tabell 1, forts.

P360	GGCGATGTAATCAGCCTAGTGCTT	14756- 14779
P14812+	ACTAAGGACATACTTGAAGC	14812- 14831
P230-	CCGGGACTTCTACTTTTAAG	230-211
P998-	TTTGGATATCGCCTGAGAGG	998-979
P1898-	AAAGGTGGCCATGTTTGTC	1898-1879
P2617-	TGATAGTCAACTTTACTTAC	2617-2598
P3328-	GCAGAATCAAAGTACAGCCC	3330-3311
P3610-	CTTGCCAACTCAACAAGATC	3612-3593
P3990-	GATTAGCATAGTATCCACTG	3992-3973
NDV3-M	TCTCCCCGGGGCAGCTTATTTCTT AAAAGGAT	4400-4368
P4593-	GACAGATGCAACTCAGTACC	4625-4606
P4618- (LS)	ATGCAACTCAGTACCAGCGC	4620-4601
P5390-	GTAGAGTTACCTGTATACCC	5411-5392
NDV3-F	ACTACCCGGGAAACCTTCGTTCCCT CAT	6238-6212
P6710- (LS)	TCTCAGTTTITAACAATGCC	6712-6693
P7093- (LS)	GTTGATGGAACGCAGAGTAG	7095-7076
P7522- (LS)	CTGCTGGATGCGTTTCCCAC	7524-7505
P367	AGGGACCTCAATACTAGCCAGTTC	8692-8666
P9905-	CTCTATCAAGAGGCGATTAG	9907-9888
P10320-	TAAGACAGTACTTTTGCAGG	10322- 10303
P10684-	GATGCAACTGTGTCAACACC	10687- 10706
P11122-	AATTGGGCAGGAGTCAGAAC	11124- 11105
P11510-	TGCCTCCATGATAGCATGCG	11512- 11493

Tabell 1, forts.

P11903-	ATTGCTTGGAAGATGGAACC	11905- 11886
P12717-	TGTCATACACTATTATGGCG	12719- 12700
P13141	CAAAGAGTACCGTGTACAGACAGC ATAACC	13172- 13143
P13281-	GACATGATAGAGCTCACCTG	13302- 13283
P14101-	ACGGAATGCATGGCAATCAG	14163- 14144
P14522-	GCTCACCAAACCTCTCTGCAC	14524- 14505
P14687-	AGGATCTGTCTCGTGCACTG	14709- 14690
P377	TTTCCTTAAGTTTGGTAATACCTA GGAC	14888- 14861
P359	CACCAAGTCGACAATTGGCCAGAA AAGGAG	15046- 15017
5NDV	ACCAAACAAAGATTTGGTGAATGA CGA	15186- 15159

Tabell 2

Sekvens av 3'- og 5'-terminale ender av genomet av NDV-stamme La Sota

A. Sekvens av 3' terminal ende (vist som 5'-ende av antigenomisk DNA-kjede)

5

metode I	stamme	sekvens
10	04	ACCAAACAGAGAATC
	05	ACCAAACAGAGAATC
	13	ACCAAACAGAGAATC
	21	ACCAAACAGAGAATC
15 metode II	stamme	sekvens
20	26	ACCAAACAGAGAATC
	28	ACCAAACAGAGAATC
	30	ACCAAACAGAGAATC
	31	GCCAAACAGAGAATC
	32	ACCAAACAGAGAATC
	33	ACCAAACAGAGAATC
25	Consensus	<u>ACCAAACAGAGAATC</u>

B. Sekvens av 5'-terminal ende (vist som DNA)

30 pBluescriptII-TSK	stammer	stamme	sekvens
35		r3101-13	ACCAAACAAAGATTT
		r3101-14	ACCAAACAAAGATTT
		r3101-15	ACCAAACAAAGATTT
		r2601-17	ACCAAACAAAGATTT
		r2601-18	ACCAAACAAAGATTT

(tabell 2 forts.)

		r2601-19	ACCAAACAAAGATTT
5		r2601-20	AACAAGGTGAAGATA
		r2601-21	ACCAAACAAAGATTT
	pGEM4Z stammer	stamme	sekvens
10		r3101-16	ACCAAACAAAGATTT
		r3101-17	ACCAAACAAAGATTT
		r3101-18	ACCAAACAAAGATTT
		r3101-19	ACCAAACAAAGATTT
		r3101-22	ACCAAACAAAGATTT
15		Consensus	ACCAAACAAAGATTT

Tabell 3

Minigenom replikasjon med NDV-hjelpervirus

5 A. SEAP-aktivitet (cps) etter transfeksjon av CER-C9-celler med pOLTV535- og pOLTV553-serier av plasmider.

	plasmid	+NDV	-NDV	forhold
10	pOLTV535N0	3.5×10^4	7.1×10^4	0.49
	pOLTV535N1	5.9	12.1	0.49
	pOLTV535N2	2.4	6.2	0.39
	pOLTV535N3	7.6	5.2	1.46
	pOLTV535N4	1.8	4.1	0.44
	pOLTV535N5	1.5	3.0	0.50
15	pOLTV553N0	5.5×10^3	9.6×10^3	0.57
	pOLTV553N1	9.6	27.6	0.35
	pOLTV553N2	2.4	3.5	0.68
	pOLTV553N3	15.1	9.5	1.59
	pOLTV553N4	3.4	7.9	0.43
	pOLTV553N5	2.9	4.8	0.60

B. SEAP-aktivitet (cps) etter transfeksjon av FPV-T7-infiserte CER-celler med pOLTV553-serien av plasmider.

	Plasmid	+NDV	-NDV	forhold
25	pOLTV553N0	7.2×10^4	8.3×10^4	0.86
	pOLTV553N1	8.4	12.0	0.70
	pOLTV553N2	8.9	12.6	0.71
	pOLTV553N3	27.4	8.6	3.19
	pOLTV553N4	9.7	10.4	0.93
	pOLTV553N5	8.5	8.1	1.05

Tabell 4.

5 Overføring av SEAP-aktivitet (cps) etter behandling av CER-celler med supernatanten av FPV-T7-infiserte CER-celler som var blitt transfektert med pOLTV553 -serien av plasmider og som var blitt superinfisert med NDV (se tabell 3).

	Plasmid	
10	pOLTV553N0	2.4×10^3
	pOLTV553N1	6.2
	pOLTV553N2	2.0
	pOLTV553N3	20.6
15	pOLTV553N4	2.0
	pOLTV553N5	2.1

Tabell 5

5 SEAP-aktivitet (cps) etter ko-transfeksjon av CER-celler med pOLTV553-serien av plasmider og plasmider pCIneoNP, pCIneoP og pCIneoL(c) (eller pCIneo som en negativ kontroll).

	Plasmid- forhold	NP, P & L	NP, P & pCIneo	
10	pOLTV553N0	3.1×10^4	2.7×10^3	11.7
	pOLTV553N1	4.1	5.2	7.9
	pOLTV553N2	3.1	3.1	10.0
	pOLTV553N3	35.9	3.6	100.8
15	pOLTV553N4	1.9	4.6	4.1
	pOLTV553N5	1.0	4.1	2.5

P A T E N T K R A V

1. Fugleparamyksovirus cDNA som minst omfatter en nukleinsyresekvens tilsvarende den 5'-terminale ende av Newcastle-sykdomsvirus som vist i figur 6 og som tillater å
5 danne en infeksjonsdyktig kopi av fugleparamyksovirus.
2. cDNA ifølge krav 1 omfattende fullengdet cDNA.
3. cDNA som minst omfatter en nukleinsyresekvens tilsvarende 5'-terminal ende av genomet av Newcastle-sykdomsvirus som vist i figur 6 og som tillater å danne et replikerende
10 fugleparamyksovirus minigenom.
4. cDNA ifølge kravene 1, 2 eller 3 som er minst delvis avledet fra Newcastle Disease Virus.
5. cDNA ifølge krav 4 hvor nevnte Newcastle Disease Virus er et lentogent virus, fortrinnsvis avledet fra en vaksine-
15 stamme.
6. cDNA ifølge krav 5 hvor nevnte vaksinstamme er en LaSota-stamme ATCC VR-699.
7. cDNA ifølge ethvert av kravene 1 til 6 ytterligere utstyrt med en modifikasjon i nukleinsyren valgt fra dele-
20 sjon, innsetning og mutasjon.
8. cDNA ifølge krav 7 hvor nevnte modifikasjon resulterer i en nukleinsyre som koder for et modifisert proteasespaltingssete.
9. cDNA ifølge krav 8 hvor nevnte spaltingssete er et
25 proteasespaltingssete av fusjons(F)proteinet.
10. cDNA ifølge krav 7 hvor nevnte modifikasjon resulterer i en nukleinsyre som koder for et viralt hybridprotein.

11. cDNA ifølge krav 10 hvor nevnte protein er et hemagglutinin-neuraminidase (HN)-protein.
12. cDNA ifølge krav 7 hvor nevnte modifikasjon omfatter en delesjon i en nukleinsyre som koder for et viralt protein.
5
13. cDNA ifølge krav 12 hvor nevnte virale protein er et matriseprotein (M).
14. cDNA ifølge ethvert av kravene 1 - 13, ytterligere utstyrt med en nukleinsyre som koder for et heterologt antigen.
10
15. cDNA ifølge krav 14 hvor nevnte antigen er avledet fra et fuglepatogen.
16. cDNA ifølge krav 14 eller 15 ytterligere utstyrt med en nukleinsyre som koder for et immunstimulatorisk protein eller deler derav.
15
17. RNA oppnådd fra et cDNA i henhold til ethvert av kravene 1 - 16.
18. Fremgangsmåte ved fremstilling av infeksjonsdyktig kopi av fugleparamyxovirus omfattende å transfektere minst en celle med cDNA i henhold til ethvert av kravene 1 - 16.
20
19. Fremgangsmåte ifølge krav 18 hvor nevnte celle er minst i stand til å uttrykke viralt nukleokapsid (NP), fosfo-(P) eller stort polymerase (L)protein.
20. Fremgangsmåte ifølge krav 18 eller 19 ytterligere omfattende å tillate spalting av fusjonsproteinet av nevnte virus.
25

21. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 18 - 20, ytterligere omfattende å inkubere nevnte celle i vekstmedium omfattende proteolytisk aktivitet.
22. Fremgangsmåte ifølge krav 21 hvor nevnte vekstmedium
5 omfatter allantoinvæske omfattende nevnte proteolytiske aktivitet.
23. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 18 til 22 hvor nevnte celle er avledet fra en kyllingcelle.
24. Infeksjonsdyktig kopi av fugleparamyksovirus som uttrykker et heterologt antigen og som kan fremstilles ved en
10 fremgangsmåte i henhold til ethvert av kravene 18 - 23.
25. Vaksine omfattende et virus i henhold til krav 24.
26. Levende vaksine i henhold til krav 25.
27. Vaksine ifølge krav 25 eller 26 hvor nevnte infeksjonsdyktige kopi av fugleparamyksovirus er minst delvis
15 avledet fra Newcastle Disease Virus (NDV).
28. Fremgangsmåte for å skjelne uvaksinerte dyr eller dyr vaksinert med en NDV-vaksine i henhold til krav 27 fra dyr infisert med villtype NDV eller vaksinert med en umodifisert mesogen eller lentogen NDV-stamme omfattende å ta
20 minst en prøve fra nevnte dyr og bestemme i nevnte prøve tilstedeværelse av antistoff rettet mot en immunodominant epitop eller markør uttrykt av nevnte villtype eller umodifisert NDV, men ikke av nevnte vaksine.
29. Fremgangsmåte ifølge krav 28 hvor nevnte antistoff er
25 rettet mot HN- eller F-protein av NDV.
30. Fremgangsmåte ifølge krav 28 eller 29 hvor nevnte dyr er valgt fra gruppen omfattende fjærfe, fortrinnsvis kyllinger.

Transkripsjonsvektor pOLTV5

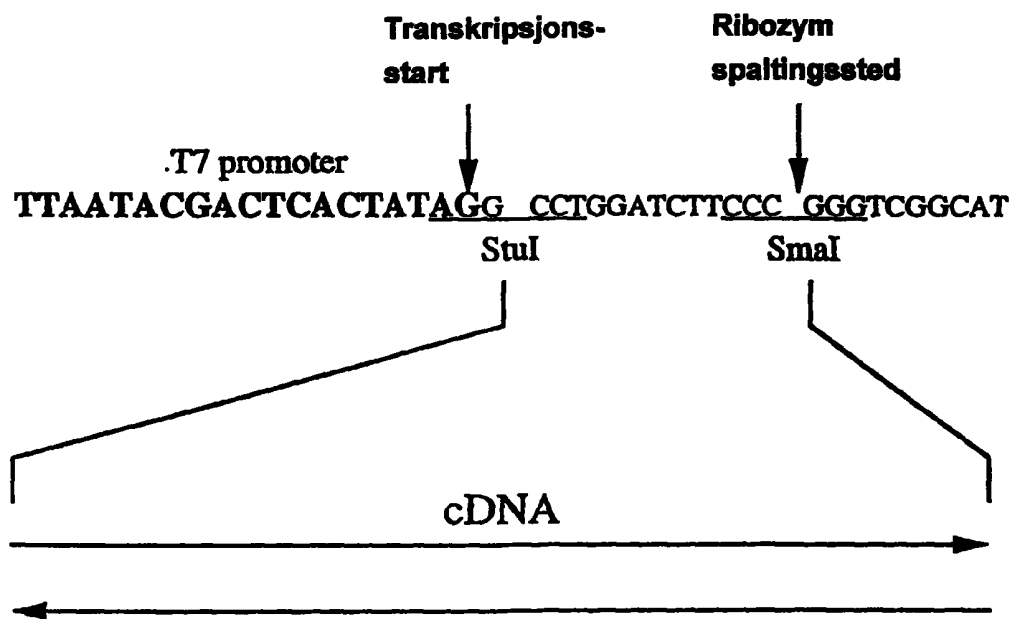


Fig. 1

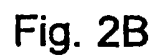
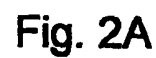


Fig. 3 Nukleotidsekvens av NDV-stamme LaSota

1	accaaacagagaatccgtgagttacgataaaaaggcgaaggagcaattgaagtcgcacgggtagaaggtgtgaatctcgag	80
81	tgcgagcccgaagcacaaactcgagaaagccttctgccaac	148
1	M S S V F D E Y E	9
149	CAG CTC CTC GCG GCT CAG ACT CGC CCC AAT GGA GCT CAT GGA GGG GGA GAA AAA GGG AGT	208
10	Q L L A A Q T R P N G A H G G G E K G S	29
209	ACC TTA AAA GTA GAC GTC CCG GTA TTC ACT CTT AAC AGT GAT GAC CCA GAA GAT AGA TGG	268
30	T L K V D V P V F T L N S D D P E D R W	49
269	AGC TTT GTG GTA TTC TGC CTC CGG ATT GCT GTT AGC GAA GAT GCC AAC AAA CCA CTC AGG	328
50	S F V V F C L R I A V S E D A N K P L R	69
329	CAA GGT GCT CTC ATA TCT CTT TTA TGC TCC CAC TCA CAG GTA ATG AGG AAC CAT GTT GCC	388
70	Q G A L I S L L C S H S Q V M R N H V A	89
389	ATT GCA GGG AAA CAG AAT GAA GCC ACA TTG GCC GTG CTT GAG ATT GAT GGC TTT GCC AAC	448
90	I A G K Q N E A T L A V L E I D G F A N	109
449	GGC ACG CCC CAG TTC AAC AAT AGG AGT GGA GTG TCT GAA GAG AGA GCA CAG AGA TTT GCG	508
110	G T P Q F N N R S G V S E E R A Q R F A	129
509	ATG ATA GCA GGA TCT CTC CCT CGG GCA TGC AGC AAC GGA ACC CCG TTC GTC ACA GCC GGG	568
130	M I A G S L P R A C S N G T P F V T A G	149
569	GCA GAA GAT GAT GCA CCA GAA GAC ATC ACC GAT ACC CTG GAG AGG ATC CTC TCT ATC CAG	628
150	A E D D A P E D I T D T L E R I L S I Q	169
629	GCT CAA GTA TGG GTC ACA GTA GCA AAA GCC ATG ACT GCG TAT GAG ACT GCA GAT GAG TCG	688
170	A Q V W V T V A K A M T A Y E T A D E S	189
689	GAA ACA AGG CGA ATC AAT AAG TAT ATG CAG CAA GGC AGG GTC CAA AAG AAA TAC ATC CTC	748
190	E T R R I N K Y M Q Q G R V Q K K Y I L	209
749	TAC CCC GTA TGC AGG AGC ACA ATC CAA CTC ACG ATC AGA CAG TCT CTT GCA GTC CGC ATC	808
210	Y P V C R S T I Q L T I R Q S L A V R I	229
809	TTT TTG GTT AGC GAG CTC AAG AGA GGC CGC AAC ACG GCA GGT GGT ACC TCT ACT TAT TAT	868
230	F L V S E L K R G R N T A G G T S T Y Y	249
869	AAC CTG GTA GGG GAC GTA GAC TCA TAC ATC AGG AAT ACC GGG CTT ACT GCA TTC TTC TTG	928
250	N L V G D V D S Y I R N T G L T A F F L	269
929	ACA CTC AAG TAC GGA ATC AAC ACC AAG ACA TCA GCC CTT GCA CTT AGT AGC CTC TCA GGC	988
270	T L K Y G I N T K T S A L A L S S L S G	289
989	GAC ATC CAG AAG ATG AAG CAG CTC ATG CGT TTG TAT CGG ATG AAA GGA GAT AAT GCG CCG	1048
290	D I Q K M K Q L M R L Y R M K G D N A P	309
1049	TAC ATG ACA TTA CTT GGT GAT AGT GAC CAG ATG AGC TTT GCG CCT GCC GAG TAT GCA CAA	1108
310	Y M T L L G D S D Q M S F A P A E Y A Q	329

4/22

Fig. 3 forts.

1109 CTT TAC TCC TTT GCC ATG GGT ATG GCA TCA GTC CTA GAT AAA GGT ACT GGG AAA TAC CAA 1168
330 L Y S F A M G M A S V L D K G T G K Y Q 349

1169 TTT GCC AGG GAC TTT ATG AGC ACA TCA TTC TGG AGA CTT GGA GTA GAG TAC GCT CAG GCT 1228
350 F A R D F M S T S F W R L G V E Y A Q A 369

1229 CAG GGA AGT AGC ATT AAC GAG GAT ATG GCT GCC GAG CTA AAG CTA ACC CCA GCA GCA ATG 1288
370 Q G S S I N E D M A A E L K L T P A A M 389

1289 AAG GGC CTG GCA GCT GCT GCC CAA CGG GTC TCC GAC GAT ACC AGC AGC ATA TAC ATG CCT 1348
390 K G L A A A A Q R V S D D T S S I Y M P 409

1349 ACT CAA CAA GTC GGA GTC CTC ACT GGG CTT AGC GAG GGG GGG TCC CAA GCT CTA CAA GGC 1408
410 T Q Q V G V L T G L S E G G S Q A L Q G 429

1409 GGA TCG AAT AGA TCG CAA GGG CAA CCA GAA GCC GGG GAT GGG GAG ACC CAA TTC CTG GAT 1468
430 G S N R S Q G Q P E A G D G E T Q F L D 449

1469 CTG ATG AGA GCG GTA GCA AAT AGC ATG AGG GAG GCG CCA AAC TCT GCA CAG GGC ACT CCC 1528
450 L M R A V A N S M R E A P N S A Q G T P 469

1529 CAA TCG GGG CCT CCC CCA ACT CCT GGG CCA TCC CAA GAT AAC GAC ACC GAC TGG GGG TAT 1588
470 Q S G P P P T P G P S Q D N D T D W G Y 489

1589 TGA tggacaaaaccagcctgcttccacaaaacatcccaatgcctcaccgtagtcgaccctcgatttgcggtctct 1667
490 * 490

1668 atatgaccacacccctcaaacaaacatccccctcttctcctccctccctgctgtacaaactccgcacgccttagataccac 1747

1748 aggcacaatgcggctcactaacaatcaaacagagccgaggggaattagaaaaagtagcgggtagaagagggatattcaga 1827

1828 gatcaggycaagtctcccgagtctctgctctctctctacctgatagaccaggacaaac ATG GCC ACC TTT ACA 1901
1 M A T F T 5

1902 GAT GCA GAG ATC GAC GAG CTA TTT GAG ACA AGT GGA ACT GTC ATT GAC AAC ATA ATT ACA 1961
6 D A E I D E L F E T S G T V I D N I I T 25

1962 GCC CAG GGT AAA CCA GCA GAG ACT GTT GGA AGG AGT GCA ATC CCA CAA GGC AAG ACC AAG 2021
26 A Q G K P A E T V G R S A I P Q G K T K 45

2022 GTG CTG AGC GCA GCA TGG GAG AAG CAT GGG AGC ATC CAG CCA CCG GCC AGT CAA GAC AAC 2081
46 V L S A A W E K H G S I Q P P A S Q D N 65

2082 CCC GAT CGA CAG GAC AGA TCT GAC AAA CAA CCA TCC ACA CCC GAG CAA ACG ACC CCG CAT 2141
66 P D R Q D R S D K Q P S T P E Q T T P H 85

2142 GAC AGC CCG CCG GCC ACA TCC GCC GAC CAG CCC CCC ACC CAG GCC ACA GAC GAA GCC GTC 2201
86 D S P P A T S A D Q P P T Q A T D E A V 105

2202 GAC ACA CAG TTC AGG ACC GGA GCA AGC AAC TCT CTG CTG TTG ATG CTT GAC AAG CTC AGC 2261
106 D T Q F R T G A S N S L L L M L D K L S 125

2262 AAT AAA TCG TCC AAT GCT AAA AAG GGC CCA TGG TCG AGC CCC CAA GAG GGG AAT CAC CAA 2321
126 N K S S N A K K G P W S S P Q E G N H Q 145

2322 CGT CCG ACT CAA CAG CAG GGG AGT CAA CCC AGT CGC GGA AAC AGT CAG GAA AGA CCG CAG 2381
146 R P T Q Q Q G S Q P S R G N S Q E R P Q 165

5/22

Fig. 3 forts.

2382 AAC CAA GTC AAG GCC GCC CCT GGA AAC CAG GGC ACA GAC GTG AAC ACA GCA TAT CAT GGA 2441
166 N Q V K A A P G N Q G T D V N T A Y H G 185

2442 CAA TGG GAG GAG TCA CAA CTA TCA GCT GGT GCA ACC OCT CAT GCT CTC CGA TCA AGG CAG 2501
186 Q W E E S Q L S A G A T P H A L R S R Q 205

2502 AGC CAA GAC AAT ACC CTT GTA TCT GCG GAT CAT GTC CAG CCA OCT GTA GAC TTT GTG CAA 2561
206 S Q D N T L V S A D H V Q P P V D F V Q 225

2562 GCG ATG ATG TCT ATG ATG GAG GCG ATA TCA CAG AGA GTA AGT AAG GTT GAC TAT CAG CTA 2621
226 A M M S M M E A I S Q R V S K V D Y Q L 245

2622 GAT CTT GTC TTG AAA CAG ACA TCC TCC ATC CCT ATG ATG CCG TCC GAA ATC CAA CAG CTG 2681
246 D L V L K Q T S S I P M M R S E I Q Q L 265

2682 AAA ACA TCT GTT GCA GTC ATG GAA GCC AAC TTG GGA ATG ATG AAG ATT CTG GAT CCC GGT 2741
266 K T S V A V M E A N L G M M K I L D P G 285

2742 TGT GGC AAC ATT TCA TCT CTG AGT GAT CTA CCG GCA GTT GCC CGA TCT CAC CCG GTT TTA 2801
286 C A N I S S L S D L R A V A R S H P V L 305

2802 GTT TCA GGC CCT GGA GAC CCC TCT CCC TAT GTG ACA CAA GGA GGC GAA ATG GCA CTT AAT 2861
306 V S G P G D P S P Y V T Q G G E M A L N 325

2862 AAA CTT TCG CAA CCA GTG CCA CAT CCA TCT GAA TTG ATT AAA CCC GCC ACT GCA TGC GGG 2921
326 K L S Q P V P H P S E L I K P A T A C G 345

2922 CCT GAT ATA GGA GTG GAA AAG GAC ACT GTC CGT GCA TTG ATC ATG TCA CCG CCA ATG CAC 2981
346 P D I G V E K D T V R A L I M S R P M H 365

2982 CCG AGT TCT TCA GCC AAG CTC CTA AGC AAG TTA GAT GCA GCC GGG TCG ATC GAG GAA ATC 3041
366 P S S S A K L L S K L D A A G S I E E I 385

3042 AGG AAA ATC AAG CGC CTT GCT CTA AAT GGC TAA ttactactgccacacgtagcgggtccctgtccactc 3110
386 R K I K R L A L N G * 396

3111 ggcattcacacggaattctgcaccgagttccccccgcagacccaaggtccaactctccaagcggcaatcctctctcgcttc 3190

3191 ctcagccccactgaatggtcgcgtaaccgtaattaatctagctacatttaagattaagaaaaatacgggtagaattgga 3270

3271 gtgcccccaattgtgccaag ATG GAC TCA TCT AGG ACA ATT GGG CTG TAC TTT GAT TCT GCC CAT 3334
1 M D S S R T I G L Y F D S A H 15

3335 TCT TCT AGC AAC CTG TTA GCA TTT CCG ATC GTC CTA CAA GGC ACA GGA GAT GGG AAG AAG 3394
16 S S S N L L A F P I V L Q G T G D G K K 35

3395 CAA ATC GCC CCG CAA TAT AGG ATC CAG CGC CTT GAC TTG TGG ACT GAT AGT AAG GAG GAC 3454
36 Q I A P Q Y R I Q R L D L W T D S K E D 55

3455 TCA GTA TTC ATC ACC ACC TAT GGA TTC ATC TTT CAA GTT GGG AAT GAA GAA GCC ACT GTC 3514
56 S V F I T T Y G F I F Q V G N E E A T V 75

3515 GGC ATG ATC GAT GAT AAA CCC AAG CGC GAG TTA CTT TCC GCT GCG ATG CTC TGC CTA GGA 3574
76 G M I D D K P K R E L L S A A M L C L G 95

3575 AGC GTC CCA AAT ACC GGA GAC CTT ATT GAG CTG GCA AGG GCC TGT CTC ACT ATG ATA GTC 3634
96 S V P N T G D L I E L A R A C L T M I V 115

6/22

Fig. 3 forts.

3635 ACA TGC AAG AAG AGT GCA ACT AAT ACT GAG AGA ATG GTT TTC TCA GTA GTG CAG GCA CCC 3694
116 T C K K S A T N T E R M V F S V V Q A P 135

3695 CAA GTG CTG CAA AGC TGT AGG GTT GTG GCA AAC AAA TAC TCA TCA GTG AAT GCA GTC AAG 3754
136 Q V L Q S C R V V A N K Y S S V N A V K 155

3755 CAC GTG AAA GCG CCA GAG AAG ATT CCC GGG AGT GGA ACC CTA GAA TAC AAG GTG AAC TTT 3814
156 H V K A P E K I P G S G T L E Y K V N F 175

3815 GTC TCC TTG ACT GTG GTA CCG AAG AAG GAT GTC TAC AAG ATC CCA GCT GCA GTA TTG AAG 3874
176 V S L T V V P K K D V Y K I P A A V L K 195

3875 GTT TCT GGC TCG AGT CTG TAC AAT CTT GCG CTC AAT GTC ACT ATT AAT GTG GAG GTA GAC 3934
196 V S G S S L Y N L A L N V T I N V E V D 215

3935 CCG AGG AGT CCT TTG GTT AAA TCT TTG TCT AAG TCT GAC AGC GGA TAC TAT GCT AAC CTC 3994
216 P R S P L V K S L S K S D S G Y Y A N L 235

3995 TTC TTG CAT ATT GGA CTT ATG ACC ACC GTA GAT AGG AAG GGG AAG AAA GTG ACA TTT GAC 4054
236 F L H I G L M T T V D R K G K K V T F D 255

4055 AAG CTG GAA AAC AAT ATA AGG AGC CTT GAT CTA TCT GTC GGG CTC AGT GAT GTG CTC GGG 4114
256 K L E K K I R S L D L S V G L S D V L G 275

4115 CCT TCC GTG TTG GTA AAA GCA AGA GGT GCA CCG ACT AAG CTT TTG GCA CCT TTC TTC TCT 4174
276 P S V L V K A R G A R T K L L A P F F S 295

4175 AGC AGT GGG ACA GCC TGC TAT CCC ATA GCA AAT GCT TCT CCT CAG GTG GCC AAG ATA CTC 4234
296 S S G T A C Y P I A N A S P Q V A K I L 315

4235 TGG AGT CAA ACC GCG TGC CTG CCG AGC GTT AAA ATC ATT ATC CAA GCA GGT ACC CAA CGC 4294
316 W S Q T A C L R S V K I I I Q A G T Q R 335

4295 GCT GTC GCA GTG ACC GCC GAC CAC GAG GTT ACC TCT ACT AAG CTG GAG AAG GGG CAC ACC 4354
336 A V A V T A D H E V T S T K L E K G H T 355

4355 CTT GCC AAA TAC AAT CCT TTT AAG AAA TAA gctgcgtctctgagattgcgctcgcgccactcaccagat 4424
356 L A K Y N P F K K * 365

4425 catcatgacacaaaaaactaatctgtcttgattattttacagtttagttacctgtctatcaagtttagaaaaaacacgggta 4504

4505 gaagattcttgatccccggttggcgccctccaggtgcaag ATG GGC TCC AGA CCT TCT ACC AAG AAC CCA 4573
1 M G S R P S T K N P 10

4574 GCA CCT ATG ATG CTG ACT ATC CCG GTT GCG CTG GTA CTG AGT TGC ATC TGT CCG GCA AAC 4633
11 A P M M L T I R V A L V L S C I C P A N 30

4634 TCC ATT GAT GGC AGG CCT CTT GCA GCT GCA GGA ATT GTG GTT ACA GGA GAC AAA GCC GTC 4693
31 S I D G R P L A A A G I V V T G D K A V 50

4694 AAC ATA TAC ACC TCA TCC CAG ACA GGA TCA ATC ATA GTT AAG CTC CTC CCG AAT CTG CCC 4753
51 N I Y T S S Q T G S I I V K L L P N L P 70

4754 AAG GAT AAG GAG GCA TGT GCG AAA GCC CCC TTG GAT GCA TAC AAC AGG ACA TTG ACC ACT 4813
71 K D K E A C A K A P L D A Y N R T L T T 90

4814 TTG CTC ACC CCC CTT GGT GAC TCT ATC CGT AGG ATA CAA GAG TCT GTG ACT ACA TCT GGA 4873
91 L L T P L G D S I R R I Q E S V T T S G 110

Fig. 3 forts.

4874	GGG	GGG	AGA	CAG	GGG	CGC	CTT	ATA	GGC	GCC	ATT	ATT	GGC	GGT	GTG	GCT	CTT	GGG	GTT	GCA	4933
111	G	G	R	Q	G	R	L	I	G	A	I	I	G	G	V	A	L	G	V	A	130
4934	ACT	GCC	GCA	CAA	ATA	ACA	GCG	GCC	GCA	GCT	CTG	ATA	CAA	GCC	AAA	CAA	AAT	GCT	GCC	AAC	4993
131	T	A	A	Q	I	T	A	A	A	A	L	I	Q	A	K	Q	N	A	A	N	150
4994	ATC	CTC	CGA	CTT	AAA	GAG	AGC	ATT	GCC	GCA	ACC	AAT	GAG	GCT	GTG	CAT	GAG	GTC	ACT	GAC	5053
151	I	L	R	L	K	E	S	I	A	A	T	N	E	A	V	H	E	V	T	D	170
5054	GGA	TTA	TCG	CAA	CTA	GCA	GTG	GCA	GTT	GGG	AAG	ATG	CAG	CAG	TTT	GTT	AAT	GAC	CAA	TTT	5113
171	G	L	S	Q	L	A	V	A	V	G	K	M	Q	Q	F	V	N	D	Q	F	190
5114	AAT	AAA	ACA	GCT	CAG	GAA	TTA	GAC	TGC	ATC	AAA	ATT	GCA	CAG	CAA	GTT	GGT	GTA	GAG	CTC	5173
191	N	K	T	A	Q	E	L	D	C	I	K	I	A	Q	Q	V	G	V	E	L	210
5174	AAC	CTG	TAC	CTA	ACC	GAA	TTG	ACT	ACA	GTA	TTC	GGA	CCA	CAA	ATC	ACT	TCA	CCT	GCT	TTA	5233
211	N	L	Y	L	T	E	L	T	T	V	F	G	P	Q	I	T	S	P	A	L	230
5234	AAC	AAG	CTG	ACT	ATT	CAG	GCA	CTT	TAC	AAT	CTA	GCT	GGT	GGA	AAT	ATG	GAT	TAC	TTA	TTG	5293
231	N	K	L	T	I	Q	A	L	Y	N	L	A	G	G	N	M	D	Y	L	L	250
5294	ACT	AAG	TTA	GGT	GTA	GGG	AAC	AAT	CAA	CTC	AGC	TCA	TTA	ATC	GGT	AGC	GGC	TTA	ATC	ACC	5353
251	T	K	L	G	V	G	N	N	Q	L	S	S	L	I	G	S	G	L	I	T	270
5354	GGT	AAC	CCT	ATT	CTA	TAC	GAC	TCA	CAG	ACT	CAA	CTC	TTG	GGT	ATA	CAG	GTA	ACT	CTA	CCT	5413
271	G	N	P	I	L	Y	D	S	Q	T	Q	L	L	G	I	Q	V	T	L	P	290
5414	TCA	GTC	GGG	AAC	CTA	AAT	AAT	ATG	CGT	GCC	ACC	TAC	TTG	GAA	ACC	TTA	TCC	GTA	AGC	ACA	5473
291	S	V	G	N	L	N	N	M	R	A	T	Y	L	E	T	L	S	V	S	T	310
5474	ACC	AGG	GGA	TTT	GCC	TCG	GCA	CTT	GTC	CCC	AAA	GTG	GTG	ACA	CAG	GTC	GGT	TCT	GTG	ATA	5533
311	T	R	G	F	A	S	A	L	V	P	K	V	V	T	Q	V	G	S	V	I	330
5534	GAA	GAA	CTT	GAC	ACC	TCA	TAC	TGT	ATA	GAA	ACT	GAC	TTA	GAT	TTA	TAT	TGT	ACA	AGA	ATA	5593
331	E	E	L	D	T	S	Y	C	I	E	T	D	L	D	L	Y	C	T	R	I	350
5594	GTA	ACG	TTC	CCT	ATG	TCC	CCT	GGT	ATT	TAT	TCC	TGC	TTG	AGC	GGC	AAT	ACG	TCG	GCC	TGT	5653
351	V	T	F	P	M	S	P	G	I	Y	S	C	L	S	G	N	T	S	A	C	370
5654	ATG	TAC	TCA	AAG	ACC	GAA	GGC	GCA	CTT	ACT	ACA	CCA	TAC	ATG	ACT	ATC	AAA	GGT	TCA	GTC	5713
371	M	Y	S	K	T	E	G	A	L	T	T	P	Y	M	T	I	K	G	S	V	390
5714	ATC	GCC	AAC	TGC	AAG	ATG	ACA	ACA	TGT	AGA	TGT	GTA	AAC	CCC	CCG	GGT	ATC	ATA	TCG	CAA	5773
391	I	A	N	C	K	M	T	T	C	R	C	V	N	P	P	G	I	I	S	Q	410
5774	AAC	TAT	GGA	GAA	GCC	GTG	TCT	CTA	ATA	GAT	AAA	CAA	TCA	TGC	AAT	GTT	TTA	TCC	TTA	GGC	5833
411	N	Y	G	E	A	V	S	L	I	D	K	Q	S	C	N	V	L	S	L	G	430
5834	GGG	ATA	ACT	TTA	AGG	CTC	AGT	GGG	GAA	TTC	GAT	GTA	ACT	TAT	CAG	AAG	AAT	ATC	TCA	ATA	5893
431	G	I	T	L	R	L	S	G	E	F	D	V	T	Y	Q	K	N	I	S	I	450
5894	CAA	GAT	TCT	CAA	GTA	ATA	ATA	ACA	GGC	AAT	CTT	GAT	ATC	TCA	ACT	GAG	CTT	GGG	AAT	GTC	5953
451	Q	D	S	Q	V	I	I	T	G	N	L	D	I	S	T	E	L	G	N	V	470
5954	AAC	AAC	TCG	ATC	AGT	AAT	GCT	TTG	AAT	AAG	TTA	GAG	GAA	AGC	AAC	AGA	AAA	CTA	GAC	AAA	6013
471	N	N	S	I	S	N	A	L	N	K	L	E	E	S	N	R	K	L	D	K	490
6014	GTC	AAT	GTC	AAA	CTG	ACT	AGC	ACA	TCT	GCT	CTC	ATT	ACC	TAT	ATC	GTT	TTG	ACT	ATC	ATA	6073
491	V	N	V	K	L	T	S	T	S	A	L	I	T	Y	I	V	L	T	I	I	510

8/22

Fig. 3 forts.

6074 TCT CTT GTT TTT GGT ATA CTT AGC CTG ATT CTA GCA TGC TAC CTA ATG TAC AAG CAA AAG 6133
511 S L V F G I L S L I L A C Y L M Y K Q K 530

6134 GCG CAA CAA AAG ACC TTA TTA TGG CTT GGG AAT AAT ACT CTA GAT CAG ATG AGA GCC ACT 6193
531 A Q Q K T L L W L G N N T L D Q M R A T 550

6194 ACA AAA ATG TGA acacagatgaggaacgaaggtttccctaataagtaatttgtgtgaaagttctggtagctctgtcag 6269
551 T K M * 554

6270 ttacagagagttaagaaaaaactaccggtttagatgaccaaaggacgatatacgggtagaacggtaagagaggccgcccc 6349

6350 tcaattgcgagccaggettccacaacctccgttctaccgcttcaccgacaacagtcctcaatc ATG GAC CGC GCC 6423
1 M D R A 4

6424 GTT AGC CAA GTT GCG TTA GAG AAT GAT GAA AGA GAG GCA AAA AAT ACA TGG CGC TTG ATA 6483
5 V S Q V A L E N D E R E A K N T W R L I 24

6484 TTC CGG ATT GCA ATC TTA TTC TTA ACA GTA GTG ACC TTG GCT ATA TCT GTA GCC TCC CTT 6543
25 F R I A I L F L T V V T L A I S V A S L 44

6544 TTA TAT AGC ATG GGG GCT AGC ACA CCT AGC GAT CTT GTA GGC ATA CCG ACT AGG ATT TCC 6603
45 L Y S M G A S T P S D L V G I P T R I S 64

6604 AGG GCA GAA GAA AAG ATT ACA TCT ACA CTT GGT TCC AAT CAA GAT GTA GTA GAT AGG ATA 6663
65 R A E E K I T S T L G S N Q D V V D R I 84

6664 TAT AAG CAA GTG GCC CTT GAG TCT CCG TTG GCA TTG TTA AAT ACT GAG ACC ACA ATT ATG 6723
85 Y K Q V A L E S P L A L L N T E T T I M 104

6724 AAC GCA ATA ACA TCT CTC TCT TAT CAG ATT AAT GGA GCT GCA AAC AAC AGT GGG TGG GGG 6783
105 N A I T S L S Y Q I N G A A N N S G W G 124

6784 GCA CCT ATC CAT GAC CCA GAT TAT ATA GGG GGG ATA GGC AAA GAA CTC ATT GTA GAT GAT 6843
125 A P I H D P D Y I G G I G K E L I V D D 144

6844 GCT AGT GAT GTC ACA TCA TTC TAT CCC TCT GCA TTT CAA GAA CAT CTG AAT TTT ATC CCG 6903
145 A S D V T S F Y P S A F Q E H L N F I P 164

6904 GCG CCT ACT ACA GGA TCA GGT TGC ACT CGA ATA CCC TCA TTT GAC ATG AGT GCT ACC CAT 6963
165 A P T T G S G C T R I P S F D M S A T H 184

6964 TAC TGC TAC ACC CAT AAT GTA ATA TTG TCT GGA TGC AGA GAT CAC TCA CAT TCA TAT CAG 7023
185 Y C Y T H N V I L S G C R D H S H S Y Q 204

7024 TAT TTA GCA CTT GGT GTG CTC CGG ACA TCT GCA ACA GGG AGG GTA TTC TTT TCT ACT CTG 7083
205 Y L A L G V L R T S A T G R V F F S T L 224

7084 CGT TCC ATC AAC CTG GAC GAC ACC CAA AAT CGG AAG TCT TGC AGT GTG AGT GCA ACT CCC 7143
225 R S I N L D D T Q N R K S C S V S A T P 244

7144 CTG GGT TGT GAT ATG CTG TGC TCG AAA GTC ACG GAG ACA GAG GAA GAA GAT TAT AAC TCA 7203
245 L G C D M L C S K V T E T E E E D Y N S 264

7204 GCT GTC CCT ACG CGG ATG GTA CAT GGG AGG TTA GGG TTC GAC GGC CAG TAC CAC GAA AAG 7263
265 A V P T R M V H G R L G F D G Q Y H E K 284

7264 GAC CTA GAT GTC ACA ACA TTA TTC GGG GAC TGG GTG GCC AAC TAC CCA GGA GTA GGG GGT 7323
285 D L D V T T L F G D W V A N Y P G V G G 304

9/22

Fig. 3 forts.

7324 GGA TCT TTT ATT GAC AGC CGC GTA TGG TTC TCA GTC TAC GGA GGG TTA AAA CCC AAT TCA 7383
305 G S F I D S R V W F S V Y G G L K P N S 324

7384 CCC AGT GAC ACT GTA CAG GAA GGG AAA TAT GTG ATA TAC AAG CGA TAC AAT GAC ACA TGC 7443
325 P S D T V Q E G K Y V I Y K R Y N D T C 344

7444 CCA GAT GAG CAA GAC TAC CAG ATT CGA ATG GCC AAG TCT TCG TAT AAG CCT GGA CGG TTT 7503
345 P D E Q D Y Q I R M A K S S Y K P G R F 364

7504 GGT GGG AAA CGC ATA CAG GCT ATC TTA TCT ATC AAG GTG TCA ACA TCC TTA GGC GAA 7563
365 G G K R I Q Q A I L S I K V S T S L G E 384

7564 GAC CCG GTA CTG ACT GTA CCG CCC AAC ACA GTC ACA CTC ATG GGG GCC GAA GGC AGA ATT 7623
385 D P V L T V P P N T V T L M G A E G R I 404

7624 CTC ACA GTA GGG ACA TCT CAT TTC TTG TAT CAA CGA GGG TCA TCA TAC TTC TCT CCC GCG 7683
405 L T V G T S H F L Y Q R G S S Y F S P A 424

7684 TTA TTA TAT CCT ATG ACA GTC AGC AAC AAA ACA GCC ACT CTT CAT AGT CCT TAT ACA TTC 7743
425 L L Y P M T V S N K T A T L H S P Y T F 444

7744 AAT GCC TTC ACT CGG CCA GGT AGT ATC CCT TGC CAG GCT TCA GCA AGA TGC CCC AAC TCG 7803
445 N A F T R P G S I P C Q A S A R C P N S 464

7804 TGT GTT ACT GGA GTC TAT ACA GAT CCA TAT CCC CTA ATC TTC TAT AGA AAC CAC ACC TTG 7863
465 C V T G V Y T D P Y P L I F Y R N H T L 484

7864 CGA GGG GTA TTC GGG ACA ATG CTT GAT GGT GTA CAA GCA AGA CTT AAC CCT GCG TCT GCA 7923
485 R G V F G T M L D G V Q A R L N P A S A 504

7924 GTA TTC GAT AGC ACA TCC CGC AGT CGC ATT ACT CGA GTG AGT TCA AGC AGT ACC AAA GCA 7983
505 V F D S T S R S R I T R V S S S S T K A 524

7984 GCA TAC ACA ACA TCA ACT TGT TTT AAA GTG GTC AAG ACT AAT AAG ACC TAT TGT CTC AGC 8043
525 A Y T T S T C F K V V K T N K T Y C L S 544

8044 ATT GCT GAA ATA TCT AAT ACT CTC TTC GGA GAA TTC AGA ATC GTC CCG TTA CTA GTT GAG 8103
545 I A E I S N T L F G E F R I V P L L V E 564

8104 ATC CTC AAA GAT GAC GGG GTT AGA GAA GCC AGG TCT GGC TAG ttgagtcaattataaaggagttgg 8169
565 I L K D D G V R E A R S G * 578

8170 aaagatggcattgtatcacctatcttctgcgacatcaagaatcaaaccgaatgccggcggtgctegaattccatgttgc 8249

8250 cagttgaccacaatcagccagtgctcatgcgatcagattaagccttgtcattaatctcttgattaagaaaaaatgtaagt 8329

8330 ggcaatgagatacaaggcaaaacagctcatggttaataatacgggtaggac ATG GCG AGC TCC GGT CCT GAA 8401
1 M A S S G P E 7

8402 AGG GCA GAG CAT CAG ATT ATC CTA CCA GAG CCA CAC CTG TCT TCA CCA TTG GTC AAG CAC 8461
8 R A E H Q I I L P E P H L S S P L V K H 27

8462 AAA CTA CTC TAT TAC TGG AAA TTA ACT GGG CTA CCG CTT CCT GAT GAA TGT GAC TTC GAC 8521
28 K L L Y Y W K L T G L P L P D E C D F D 47

8522 CAC CTC ATT CTC AGC CGA CAA TGG AAA AAA ATA CTT GAA TCG GCC TCT CCT GAT ACT GAG 8581
48 H L I L S R Q W K K I L E S A S P D T E 67

10/22

Fig. 3 forts.

8582	AGA	ATG	ATA	AAA	CTC	GGA	AGG	GCA	GTA	CAC	CAA	ACT	CTT	AAC	CAC	AAT	TCC	AGA	ATA	ACC	8641
68	R	M	I	K	L	G	R	A	V	H	Q	T	L	N	H	N	S	R	I	T	87
8642	GGA	GTG	CTC	CAC	CCC	AGG	TGT	TTA	GAA	CAA	CTG	GCT	AAT	ATT	GAG	GTC	CCA	GAT	TCA	ACC	8701
88	G	V	L	H	P	R	C	L	E	Q	L	A	N	I	E	V	P	D	S	T	107
8702	AAC	AAA	TTT	CGG	AAG	ATT	GAG	AAG	AAG	ATC	CAA	ATT	CAC	AAC	ACG	AGA	TAT	GGA	GAA	CTG	8761
108	N	K	F	R	K	I	E	K	K	I	Q	I	H	N	T	R	Y	G	E	L	127
8762	TTC	ACA	AGG	CTG	TGT	ACG	CAT	ATA	GAG	AAG	AAA	CTG	CTG	GGG	TCA	TCT	TGG	TCT	AAC	AAT	8821
128	F	T	R	L	C	T	H	I	E	K	K	L	L	G	S	S	W	S	N	N	147
8822	GTC	CCC	CGG	TCA	GAG	GAG	TTC	AGC	AGC	ATT	CGT	ACG	GAT	CCG	GCA	TTC	TGG	TTT	CAC	TCA	8881
148	V	P	R	S	E	E	F	S	S	I	R	T	D	P	A	F	W	F	H	S	167
8882	AAA	TGG	TCC	ACA	GCC	AAG	TTT	GCA	TGG	CTC	CAT	ATA	AAA	CAG	ATC	CAG	AGG	CAT	CTG	ATG	8941
168	K	W	S	T	A	K	F	A	W	L	H	I	K	Q	I	Q	R	H	L	M	187
8942	GTG	GCA	GCT	AAG	ACA	AGG	TCT	GCG	GCC	AAC	AAA	TTG	GTG	ATG	CTA	ACC	CAT	AAG	GTA	GGC	9001
188	V	A	A	K	T	R	S	A	A	N	K	L	V	M	L	T	H	K	V	G	207
9002	CAA	GTC	TTT	GTC	ACT	CCT	GAA	CTT	GTC	GTT	GTG	ACG	CAT	ACG	AAT	GAG	AAC	AAG	TTC	ACA	9061
208	Q	V	F	V	T	P	E	L	V	V	V	T	H	T	N	E	N	K	F	T	227
9062	TGT	CTT	ACC	CAG	GAA	CTT	GTA	TTG	ATG	TAT	GCA	GAT	ATG	ATG	GAG	GGC	AGA	GAT	ATG	GTC	9121
228	C	L	T	Q	E	L	V	L	M	Y	A	D	M	M	E	G	R	D	M	V	247
9122	AAC	ATA	ATA	TCA	ACC	ACG	GCG	GTG	CAT	CTC	AGA	AGC	TTA	TCA	GAG	AAA	ATT	GAT	GAC	ATT	9181
248	N	I	I	S	T	T	A	V	H	L	R	S	L	S	E	K	I	D	D	I	267
9182	TTG	CGG	TTA	ATA	GAC	GCT	CTG	GCA	AAA	GAC	TTG	GGT	AAT	CAA	GTC	TAC	GAT	GTT	GTA	TCA	9241
268	L	R	L	I	D	A	L	A	K	D	L	G	N	Q	V	Y	D	V	V	S	287
9242	CTA	ATG	GAG	GGA	TTT	GCA	TAC	GGA	GCT	GTC	CAG	CTA	CTC	GAG	CCG	TCA	GGT	ACA	TTT	GCA	9301
288	L	M	E	G	F	A	Y	G	A	V	Q	L	L	E	P	S	G	T	F	A	307
9302	GGA	GAT	TTC	TTC	GCA	TTC	AAC	CTG	CAG	GAG	CTT	AAA	GAC	ATT	CTA	ATT	GGC	CTC	CTC	CCC	9361
308	G	D	F	F	A	F	N	L	Q	E	L	K	D	I	L	I	G	L	L	P	327
9362	AAT	GAT	ATA	GCA	GAA	TCC	GTG	ACT	CAT	GCA	ATC	GCT	ACT	GTA	TTC	TCT	GGT	TTA	GAA	CAG	9421
328	N	D	I	A	E	S	V	T	H	A	I	A	T	V	F	S	G	L	E	Q	347
9422	AAT	CAA	GCA	GCT	GAG	ATG	TTG	TGT	CTG	TTG	CGT	CTG	TGG	GGT	CAC	CCA	CTG	CTT	GAG	TCC	9481
348	N	Q	A	A	E	M	L	C	L	L	R	L	W	G	H	P	L	L	E	S	367
9482	CGT	ATT	GCA	GCA	AAG	GCA	GTC	AGG	AGC	CAA	ATG	TGC	GCA	CCG	AAA	ATG	GTA	GAC	TTT	GAT	9541
368	R	I	A	A	K	A	V	R	S	Q	M	C	A	P	K	M	V	D	F	D	387
9542	ATG	ATC	CTT	CAG	GTA	CTG	TCT	TTC	TTC	AAG	GGA	ACA	ATC	ATC	AAC	GGG	TAC	AGA	AAG	AAG	9601
388	M	I	L	Q	V	L	S	F	F	K	G	T	I	I	N	G	Y	R	K	K	407
9602	AAT	GCA	GGT	GTG	TGG	CCG	CGA	GTC	AAA	GTG	GAT	ACA	ATA	TAT	GGG	AAG	GTC	ATT	GGG	CAA	9661
408	N	A	G	V	W	P	R	V	K	V	D	T	I	Y	G	K	V	I	G	Q	427
9662	CTA	CAT	GCA	GAT	TCA	GCA	GAG	ATT	TCA	CAC	GAT	ATC	ATG	TTG	AGA	GAG	TAT	AAG	AGT	TTA	9721
428	L	H	A	D	S	A	E	I	S	H	D	I	M	L	R	E	Y	K	S	L	447
9722	TCT	GCA	CTT	GAA	TTT	GAG	CCA	TGT	ATA	GAA	TAT	GAC	CCT	GTC	ACC	AAC	CTG	AGC	ATG	TTC	9781
448	S	A	L	E	F	E	P	C	I	E	Y	D	P	V	T	N	L	S	M	F	467

11/22

Fig. 3 forts.

9782	CTA AAA GAC AAG GCA ATC GCA CAC CCC AAC GAT AAT TGG CTT GGC TCG TTT AGG CGG AAC	9841
468	L K D K A I A H P N D N W L A S F R R N	487
9842	CTT CTC TCC GAA GAC CAG AAG AAA CAT GTA AAA GAA GCA ACT TCG ACT AAT CGC CTC TTG	9901
488	L L S E D Q K K H V K E A T S T N R L L	507
9902	ATA GAG TTT TTA GAG TCA AAT GAT TTT GAT CCA TAT AAA GAG ATG GAA TAT CTG ACG ACC	9961
508	I E F L E S N D F D P Y K E M E Y L T T	527
9962	CTT GAG TAC CTT AGA GAT GAC AAT GTG GCA GTA TCA TAC TCG CTC AAG GAG AAG GAA GTG	10021
528	L E Y L R D D N V A V S Y S L K E K E V	547
10022	AAA GTT AAT GGA CGG ATC TTC GCT AAG CTG ACA AAG AAG TTA AGG AAC TGT CAG GTG ATG	10081
548	K V N G R I F A K L T K K L R N C Q V M	567
10082	GCG GAA GGG ATC CTA GCC GAT CAG ATT GCA CCT TTC TTT CAG GGA AAT GGA GTC ATT CAG	10141
568	A E G I L A D Q I A P F F Q G N G V I Q	587
10142	GAT AGC ATA TCC TTG ACC AAG AGT ATG CTA GCG ATG AGT CAA CTG TCT TTT AAC AGC AAT	10201
588	D S I S L T K S M L A M S Q L S F N S N	607
10202	AAG AAA CGT ATC ACT GAC TGT AAA GAA AGA GTA TCT TCA AAC CGC AAT CAT GAT CCG AAA	10261
608	K K R I T D C K E R V S S N R N H D P K	627
10262	AGC AAG AAC CGT CGG AGA GTT GCA ACC TTC ATA ACA ACT GAC CTG CAA AAG TAC TGT CTT	10321
628	S K N R R R V A T F I T T D L Q K Y C L	647
10322	AAT TGG AGA TAT CAG ACA ATC AAA TTG TTC GCT CAT GCC ATC AAT CAG TTG ATG GGC CTA	10381
648	N W R Y Q T I K L F A H A I N Q L M G L	667
10382	CCT CAC TTC TTC GAA TGG ATT CAC CTA AGA CTG ATG GAC ACT ACG ATG TTC GTA GGA GAC	10441
668	P H F F E W I H L R L M D T T M F V G D	687
10442	CCT TTC AAT CCT CCA AGT GAC CCT ACT GAC TGT GAC CTC TCA AGA GTC CCT AAT GAT GAC	10501
688	P F N P P S D P T D C D L S R V P N D D	707
10502	ATA TAT ATT GTC AGT GCC AGA GGG GGT ATC GAA GGA TTA TGC CAG AAG CTA TGG ACA ATG	10561
708	I Y I V S A R G G I E G L C Q K L W T M	727
10562	ATC TCA ATT GCT GCA ATC CAA CTT GCT GCA GCT AGA TCG CAT TGT CGT GTT GCC TGT ATG	10621
728	I S I A A I Q L A A A R S H C R V A C M	747
10622	GTA CAG GGT GAT AAT CAA GTA ATA GCA GTA ACG AGA GAG GTA AGA TCA GAC GAC TCT CCG	10681
748	V Q G D N Q V I A V T R E V R S D D S P	767
10682	GAG ATG GTG TTG ACA CAG TTG CAT CAA GCC AGT GAT AAT TTC TTC AAG GAA TTA ATT CAT	10741
768	E M V L T Q L H Q A S D N F F K E L I H	787
10742	GTC AAT CAT TTG ATT GGC CAT AAT TTG AAG GAT CGT GAA ACC ATC AGG TCA GAC ACA TTC	10801
788	V N H L I G H N L K D R E T I R S D T F	807
10802	TTC ATA TAC AGC AAA CGA ATC TTC AAA GAT GGA GCA ATC CTC AGT CAA GTC CTC AAA AAT	10861
808	F I Y S K R I F K D G A I L S Q V L K N	827
10862	TCA TCT AAA TTA GTG CTA GTG TCA GGT GAT CTC AGT GAA AAC ACC GTA ATG TCC TGT GCC	10921
828	S S K L V L V S G D L S E N T V M S C A	847

12/22

Fig. 3 forts.

10922	AAC	ATT	GCC	TCT	ACT	GTA	GCA	CGG	CTA	TGC	GAG	AAC	GGG	CTT	CCC	AAA	GAC	TTC	TGT	TAC	10981
848	N	I	A	S	T	V	A	R	L	C	E	N	G	L	P	K	D	F	C	Y	867
10982	TAT	TTA	AAC	TAT	ATA	ATG	AGT	TGT	GTG	CAG	ACA	TAC	TTT	GAC	TCT	GAG	TTC	TCC	ATC	ACC	11041
868	Y	L	N	Y	I	M	S	C	V	Q	T	Y	F	D	S	E	F	S	I	T	887
11042	AAC	AAT	TCG	CAC	CCC	GAT	CTT	AAT	CAG	TCG	TGG	ATT	GAG	GAC	ATC	TCT	TTT	GTG	CAC	TCA	11101
888	N	N	S	H	P	D	L	N	Q	S	W	I	E	D	I	S	F	V	H	S	907
11102	TAT	GTT	CTG	ACT	CCT	GCC	CAA	TTA	GGG	GGA	CTG	AGT	AAC	CTT	CAA	TAC	TCA	AGG	CTC	TAC	11161
908	Y	V	L	T	P	A	Q	L	G	G	L	S	N	L	Q	Y	S	R	L	Y	927
11162	ACT	AGA	AAT	ATC	GGT	GAC	CCG	GGG	ACT	ACT	GCT	TTT	GCA	GAG	ATC	AAG	CGA	CTA	GAA	GCA	11221
928	T	R	N	I	G	D	P	G	T	T	A	F	A	E	I	K	R	L	E	A	947
11222	GTG	GGA	TTA	CTG	AGT	CCT	AAC	ATT	ATG	ACT	AAT	ATC	TTA	ACT	AGG	CCG	CCT	GGG	AAT	GGA	11281
948	V	G	L	L	S	P	N	I	M	T	N	I	L	T	R	P	P	G	N	G	967
11282	GAT	TGG	GCC	AGT	CTG	TGC	AAC	GAC	CCA	TAC	TCT	TTC	AAT	TTT	GAG	ACT	GTT	GCA	AGC	CCA	11341
968	D	W	A	S	L	C	N	D	P	Y	S	F	N	F	E	T	V	A	S	P	987
11342	AAT	ATT	GTT	CTT	AAG	AAA	CAT	ACG	CAA	AGA	GTC	CTA	TTT	GAA	ACT	TGT	TCA	AAT	CCC	TTA	11401
988	N	I	V	L	K	K	H	T	Q	R	V	L	F	E	T	C	S	N	P	L	1007
11402	TTG	TCT	GGA	GTG	CAC	ACA	GAG	GAT	AAT	GAG	GCA	GAA	GAG	AAG	GCA	TTG	GCT	GAA	TTC	TTG	11461
1008	L	S	G	V	H	T	E	D	N	E	A	E	E	K	A	L	A	E	F	L	1027
11462	CTT	AAT	CAA	GAG	GTG	ATT	CAT	CCC	CGC	GTT	GCG	CAT	GCC	ATC	ATG	GAG	GCA	AGC	TCT	GTA	11521
1028	L	N	Q	E	V	I	H	P	R	V	A	H	A	I	M	E	A	S	S	V	1047
11522	GGT	AGG	AGA	AAG	CAA	ATT	CAA	GGG	CTT	GTT	GAC	ACA	ACA	AAC	ACC	GTA	ATT	AAG	ATT	GCG	11581
1048	G	R	R	K	Q	I	Q	G	L	V	D	T	T	N	T	V	I	K	I	A	1067
11582	CTT	ACT	AGG	AGG	CCA	TTA	GGC	ATC	AAG	AGG	CTG	ATG	CGG	ATA	GTC	AAT	TAT	TCT	AGC	ATG	11641
1068	L	T	R	R	P	L	G	I	K	R	L	M	R	I	V	N	Y	S	S	M	1087
11642	CAT	GCA	ATG	CTG	TTT	AGA	GAC	GAT	GTT	TTT	TCC	TCC	AGT	AGA	TCC	AAC	CAC	CCC	TTA	GTC	11701
1088	H	A	M	L	F	R	D	D	V	F	S	S	S	R	S	N	H	P	L	V	1107
11702	TCT	TCT	AAT	ATG	TGT	TCT	CTG	ACA	CTG	GCA	GAC	TAT	GCA	CGG	AAT	AGA	AGC	TGG	TCA	CCT	11761
1108	S	S	N	M	C	S	L	T	L	A	D	Y	A	R	N	R	S	W	S	P	1127
11762	TTG	ACG	GGA	GGC	AGG	AAA	ATA	CTG	GGT	GTA	TCT	AAT	CCT	GAT	ACG	ATA	GAA	CTC	GTA	GAG	11821
1128	L	T	G	G	R	K	I	L	G	V	S	N	P	D	T	I	E	L	V	E	1147
11822	GGT	GAG	ATT	CTT	AGT	GTA	AGC	GGA	GGG	TGT	ACA	AGA	TGT	GAC	AGC	GGA	GAT	GAA	CAA	TTT	11881
1148	G	E	I	L	S	V	S	G	G	C	T	R	C	D	S	G	D	E	Q	F	1167
11882	ACT	TGG	TTC	CAT	CTT	CCA	AGC	AAT	ATA	GAA	TIG	ACC	GAT	GAC	ACC	AGC	AAG	AAT	CCT	CCG	11941
1168	T	W	F	H	L	P	S	N	I	E	L	T	D	D	T	S	K	N	P	P	1187
11942	ATG	AGG	GTA	CCA	TAT	CTC	GGG	TCA	AAG	ACA	CAG	GAG	AGG	AGA	GCT	GCC	TCA	CTT	GCA	AAA	12001
1188	M	R	V	P	Y	L	G	S	K	T	Q	E	R	R	A	A	S	L	A	K	1207
12002	ATA	GCT	CAT	ATG	TCG	CCA	CAT	GTA	AAG	GCT	GCC	CTA	AGG	GCA	TCA	TCC	GTG	TTG	ATC	TGG	12061
1208	I	A	H	M	S	P	H	V	K	A	A	L	R	A	S	S	V	L	I	W	1227
12062	GCT	TAT	GGG	GAT	AAT	GAA	GTA	AAT	TGG	ACT	GCT	GCT	CTT	ACG	ATT	GCA	AAA	TCT	CGG	TGT	12121
1228	A	Y	G	D	N	E	V	N	W	T	A	A	L	T	I	A	K	S	R	C	1247

Fig. 3 forts.

12122 AAT GTA AAC TTA GAG TAT CTT CGG TTA CTG TCC CCT TTA CCC ACG GCT GGG AAT CTT CAA 12181
 1248 N V N L E Y L R L L S P L P T A G N L Q 1267
 12182 CAT AGA CTA GAT GAT GGT ATA ACT CAG ATG ACA TTC ACC CCT GCA TCT CTC TAC AGG TGT 12241
 1268 H R L D D G I T Q M T F T P A S L Y R C 1287
 12242 CAC CTT ACA TTC ACA TAT CCA ATG ATT CTC AAA GGC TGT TCA CTG AAG AAG GAG TCA AAG 12301
 1288 H L T F T Y P M I L K G C S L K K E S K 1307
 12302 AGG GGA ATG TGG TTT ACC AAC AGA GTC ATG CTC TTG GGT TTA TCT CTA ATC GAA TCG ATC 12361
 1308 R G M W F T N R V M L L G L S L I E S I 1327
 12362 TTT CCA ATG ACA ACA ACC AGG ACA TAT GAT GAG ATC ACA CTG CAC CTA CAT AGT AAA TTT 12421
 1328 F P M T T T R T Y D E I T L H L H S K F 1347
 12422 AGT TGC TGT ATC AGA GAA GCA CCT GTT GCG GTT CCT TTC GAG CTA CTT GGG GTG GTA CCG 12481
 1348 S C C I R E A P V A V P F E L L G V V P 1367
 12482 GAA CTG AGG ACA GTG ACC TCA AAT AAG TTT ATG TAT GAT CCT AGC CCT GTA TCG GAG GGA 12541
 1368 E L R T V T S N K F M Y D P S P V S E G 1387
 12542 GAC TTT GCG AGA CTT GAC TTA GCT ATC TTC AAG AGT TAT GAG CTT AAT CTG GAG TCA TAT 12601
 1388 D F A R L D L A I F K S Y E L N L E S Y 1407
 12602 CCC ACG ATA GAG CTA ATG AAC ATT CTT TCA ATA TCC AGC GGG AAG TTG ATT GGC CAG TCT 12661
 1408 P T I E L M N I L S I S S G K L I G Q S 1427
 12662 GTG GTT TCT TAT GAT GAA GAT ACC TCC ATA AAG AAT GAC GCC ATA ATA GTG TAT GAC AAT 12721
 1428 V V S Y D E D T S I K N D A I I V Y D N 1447
 12722 ACC CGA AAT TGG ATC AGT GAA GCT CAG AAT TCA GAT GTG GTC CGC CTA TTT GAA TAT GCA 12781
 1448 T R N W I S E A Q N S D V V R L F E Y A 1467
 12782 GCA CTT GAA GTG CTC CTC GAC TGT TCT TAC CAA CTC TAT TAC CTG AGA GTA AGA GGC CTA 12841
 1468 A L E V L L D C S Y Q L Y Y L R V R G L 1487
 12842 GAC AAT ATT GTC TTA TAT ATG GGT GAT TTA TAC AAG AAT ATG CCA GGA ATT CTA CTT TCC 12901
 1488 D N I V L Y M G D L Y K N M P G I L L S 1507
 12902 AAC ATT GCA GCT ACA ATA TCT CAT CCC GTC ATT CAT TCA AGG TTA CAT GCA GTG GGC CTG 12961
 1508 N I A A T I S H P V I H S R L H A V G L 1527
 12962 GTC AAC CAT GAC GGA TCA CAC CAA CTT GCA GAT ACG GAT TTT ATC GAA ATG TCT GCA AAA 13021
 1528 V N H D G S H Q L A D T D F I E M S A K 1547
 13022 CTA TTA GTA TCT TGC ACC CGA CGT GTG ATC TCC GGC TTA TAT TCA GGA AAT AAG TAT GAT 13081
 1548 L L V S C T R R V I S G L Y S G N K Y D 1567
 13082 CTG CTG TTC CCA TCT GTC TTA GAT GAT AAC CTG AAT GAG AAG ATG CTT CAG CTG ATA TCC 13141
 1568 L L F P S V L D D N L N E K M L Q L I S 1587
 13142 CGG TTA TGC TGT CTG TAC ACG GTA CTC TTT GCT ACA ACA AGA GAA ATC CCG AAA ATA AGA 13201
 1588 R L C C L Y T V L F A T T R E I P K I R 1607
 13202 GGC TTA ACT GCA GAA GAG AAA TGT TCA ATA CTC ACT GAG TAT TTA CTG TCG GAT GCT GTG 13261
 1608 G L T A E E K C S I L T E Y L L S D A V 1627

14/22

Fig. 3 forts.

13262	AAA	CCA	TTA	CTT	AGC	CCC	GAT	CAA	GTG	AGC	TCT	ATC	ATG	TCT	CCT	AAC	ATA	ATT	ACA	TTC	13321
1628	K	P	L	L	S	P	D	Q	V	S	S	I	M	S	P	N	I	I	T	F	1647
13322	CCA	GCT	AAT	CTG	TAC	TAC	ATG	TCT	CGG	AAG	AGC	CTC	AAT	TTG	ATC	AGG	GAA	AGG	GAG	GAC	13381
1648	P	A	N	L	Y	Y	M	S	R	K	S	L	N	L	I	R	E	R	E	D	1667
13382	AGG	GAT	ACT	ATC	CTG	GCG	TTG	TTG	TTC	CCC	CAA	GAG	CCA	TTA	TTA	GAG	TTC	CCT	TCT	GTG	13441
1668	R	D	T	I	L	A	L	L	F	P	Q	E	P	L	L	E	F	P	S	V	1687
13442	CAA	GAT	ATT	GGT	GCT	CGA	GTG	AAA	GAT	CCA	TTC	ACC	CGA	CAA	CCT	GCG	GCA	TTT	TTG	CAA	13501
1688	Q	D	I	G	A	R	V	K	D	P	F	T	R	Q	P	A	A	F	L	Q	1707
13502	GAG	TTA	GAT	TTG	AGT	GCT	CCA	GCA	AGG	TAT	GAC	GCA	TTC	ACA	CTT	AGT	CAG	ATT	CAT	CCT	13561
1708	E	L	D	L	S	A	P	A	R	Y	D	A	F	T	L	S	Q	I	H	P	1727
13562	GAA	CTC	ACA	TCT	CCA	AAT	CCG	GAG	GAA	GAC	TAC	TTA	GTA	CGA	TAC	TTG	TTC	AGA	GGG	ATA	13621
1728	E	L	T	S	P	N	P	E	E	D	Y	L	V	R	Y	L	F	R	G	I	1747
13622	GGG	ACT	GCA	TCT	TCC	TCT	TGG	TAT	AAG	GCA	TCT	CAT	CTC	CTT	TCT	GTA	CCC	GAG	GTA	AGA	13681
1748	G	T	A	S	S	S	W	Y	K	A	S	H	L	L	S	V	P	E	V	R	1767
13682	TGT	GCA	AGA	CAC	CCC	AAC	TCC	TTA	TAC	TTA	GCT	GAA	GGG	AGC	GGA	GCC	ATC	ATG	AGT	CTT	13741
1768	C	A	R	H	G	N	S	L	Y	L	A	E	G	S	G	A	I	M	S	L	1787
13742	CTC	GAA	CTG	CAT	GTA	CCA	CAT	GAA	ACT	ATC	TAT	TAC	AAT	ACG	CTC	TTT	TCA	AAT	GAG	ATG	13801
1788	L	E	L	H	V	P	H	E	T	I	Y	Y	N	T	L	F	S	N	E	M	1807
13802	AAC	CCC	CCG	CAA	CGA	CAT	TTC	GGG	CCG	ACC	CCA	ACT	CAG	TTT	TTG	AAT	TCG	GTT	GTT	TAT	13861
1808	N	P	P	Q	R	H	F	G	P	T	P	T	Q	F	L	N	S	V	V	Y	1827
13862	AGG	AAT	CTA	CAG	GCG	GAG	GTA	ACA	TGC	AAA	GAT	GGA	TTT	GTC	CAA	GAG	TTC	CGT	CCA	TTA	13921
1828	R	N	L	Q	A	E	V	T	C	K	D	G	F	V	Q	E	F	R	P	L	1847
13922	TGG	AGA	GAA	AAT	ACA	GAG	GAA	AGT	GAC	CTG	ACC	TCA	GAT	AAA	GCA	GTG	GGG	TAT	ATT	ACA	13981
1848	W	R	E	N	T	E	E	S	D	L	T	S	D	K	A	V	G	Y	I	T	1867
13982	TCT	GCA	GTG	CCC	TAC	AGA	TCT	GTA	TCA	TTG	CTG	CAT	TGT	GAC	ATT	GAA	ATT	CCT	CCA	GGG	14041
1868	S	A	V	P	Y	R	S	V	S	L	L	H	C	D	I	E	I	P	P	G	1887
14042	TCC	AAT	CAA	AGC	TTA	CTA	GAT	CAA	CTA	GCT	ATC	AAT	TTA	TCT	CTG	ATT	GCC	ATG	CAT	TCT	14101
1888	S	N	Q	S	L	L	D	Q	L	A	I	N	L	S	L	I	A	M	H	S	1907
14102	GTA	AGG	GAG	GGC	GGG	GTA	GTA	ATC	ATC	AAA	GTG	TTG	TAT	GCA	ATG	GGA	TAC	TAC	TTT	CAT	14161
1908	V	R	E	G	G	V	V	I	I	K	V	L	Y	A	M	G	Y	Y	F	H	1927
14162	CTA	CTC	ATG	AAC	TTG	TTT	GCT	CCG	TGT	TCC	ACA	AAA	GGA	TAT	ATT	CTC	TCT	AAT	GGT	TAT	14221
1928	L	L	M	N	L	F	A	P	C	S	T	K	G	Y	I	L	S	N	G	Y	1947
14222	GCA	TGT	CGA	GGA	GAT	ATG	GAG	TGT	TAC	CTG	GTA	TTT	GTC	ATG	GGT	TAC	CTG	GGC	GGG	CCT	14281
1948	A	C	R	G	D	M	E	C	Y	L	V	F	V	M	G	Y	L	G	G	P	1967
14282	ACA	TTT	GTA	CAT	GAG	GTG	GTG	AGG	ATG	GCA	AAA	ACT	CTG	GTG	CAG	CGG	CAC	GGT	ACG	CTC	14341
1968	T	F	V	H	E	V	V	R	M	A	K	T	L	V	Q	R	H	G	T	L	1987
14342	TTG	TCT	AAA	TCA	GAT	GAG	ATC	ACA	CTG	ACC	AGG	TTA	TTC	ACC	TCA	CAG	CGG	CAG	CGT	GTG	14401
1988	L	S	K	S	D	E	I	T	L	T	R	L	F	T	S	Q	R	Q	R	V	2007
14402	ACA	GAC	ATC	CTA	TCC	AGT	CCT	TTA	CCA	AGA	TTA	ATA	AAG	TAC	TTG	AGG	AAG	AAT	ATT	GAC	14461
2008	T	D	I	L	S	S	P	L	P	R	L	I	K	Y	L	R	K	N	I	D	2027

Fig. 3 forts.

14462 ACT GCG CTG ATT GAA GGC GGG GGA CAG CCC GTC CGT CCA TTC TGT GCG GAG AGT CTG GTG 14521
 2028 T A L I E A G G Q P V R P F C A E S L V 2047

 14522 AGC ACG CTA GCG AAC ATA ACT CAG ATA ACC CAG ATT ATC GCT AGT CAC ATT GAC ACA GTT 14581
 2048 S T L A N I T Q I T Q I I A S H I D T V 2067

 14582 ATC CGG TCT GTG ATA TAT ATG GAA GCT GAG GGT GAT CTC GCT GAC ACA GTA TTT CTA TTT 14641
 2068 I R S V I Y M E A E G D L A D T V F L F 2087

 14642 ACC CCT TAC AAT CTC TCT ACT GAC GGG AAA AAG AGG ACA TCA CTT ATA CAG TGC ACG AGA 14701
 2088 T P Y N L S T D G K K R T S L I Q C T R 2107

 14702 CAG ATC CTA GAG GTT ACA ATA CTA GGT CTT AGA GTC GAA AAT CTC AAT AAA ATA GGC GAT 14761
 2108 Q I L G V T I L G L R V E N L N K I G D 2127

 14762 ATA ATC AGC CTA GTG CTT AAA GGC ATG ATC TCC ATG GAG GAC CTT ATC CCA CTA AGG ACA 14821
 2128 I I S L V L K G M I S M E D L I P L R T 2147

 14822 TAC TTG AAG CAT AGT ACC TGC CCT AAA TAT TTG AAG GCT GTC CTA GGT ATT ACC AAA CTC 14881
 2148 Y L K H S T C P K Y L K A V L G I T K L 2167

 14882 AAA GAA ATG TTT ACA GAC ACT TCT GTA TTG TAC TTG ACT CGT GCT CAA CAA AAA TTC TAC 14941
 2168 K E N F T D T S V L Y L T R A Q Q K F Y 2187

 14942 ATG AAA ACT ATA GGC AAT GCA GTC AAA GGA TAT TAC AGT AAC TGT GAC TCT TAA cgaaaatc 15003
 2188 M K T I G N A V K G Y Y S N C D S * 2205

 15004 acatattaataggctcccttttttggccaattgtattcttgttgattcaatcatattatgtagaaaaaagttgaaccctg 15083

 15084 actccttaggactcgaattcgaactcaataaatgtcttaaaaaaaggttgccgcacaattattcttgagtgtagtctcgt 15163

 15164 cattcaccaaatctttgtttggt 15186

16/22

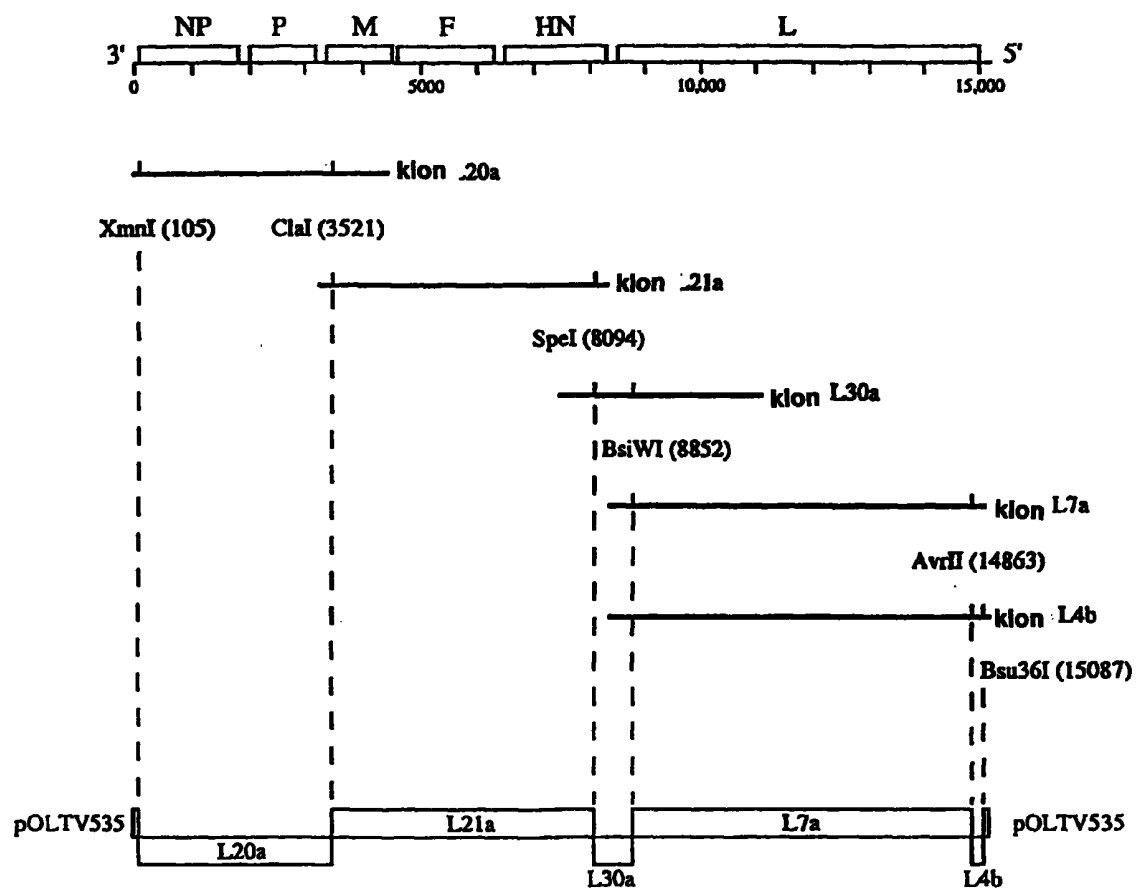
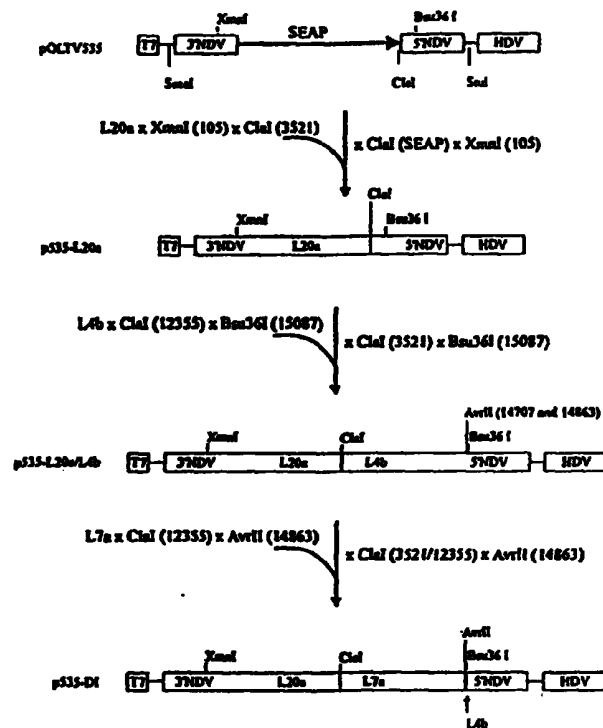


Fig. 4A

17/22

Konstruksjon av genomisk cDNA kloner av
NDV "LaSota" E13-1 i pOLTV535



A

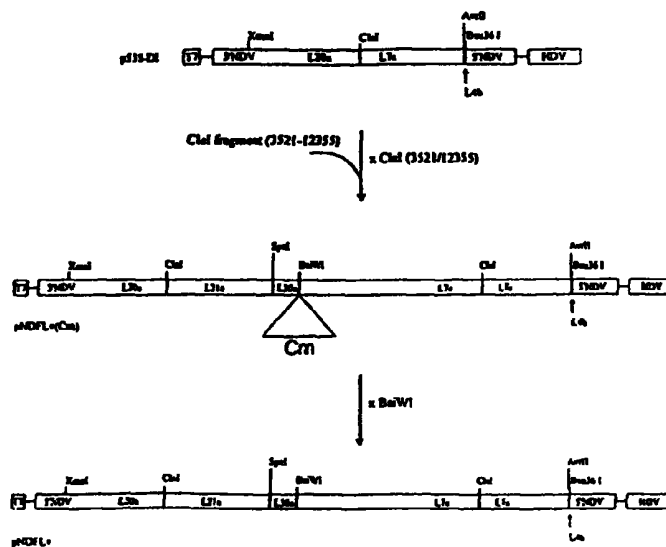


Fig. 4B

18/22

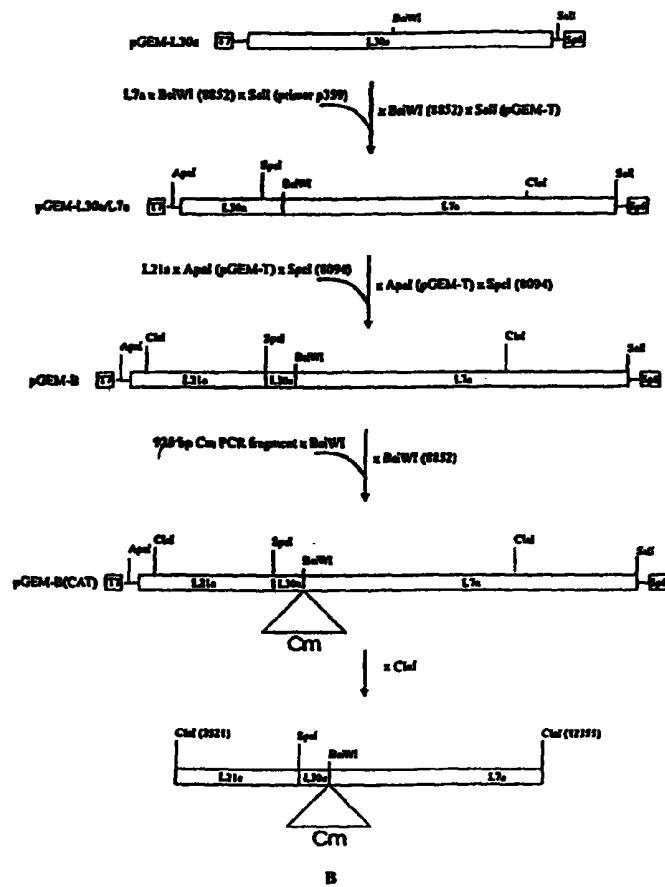


Fig. 4B forts.

19/22

Introduksjon av genetisk markør i pNDFL+

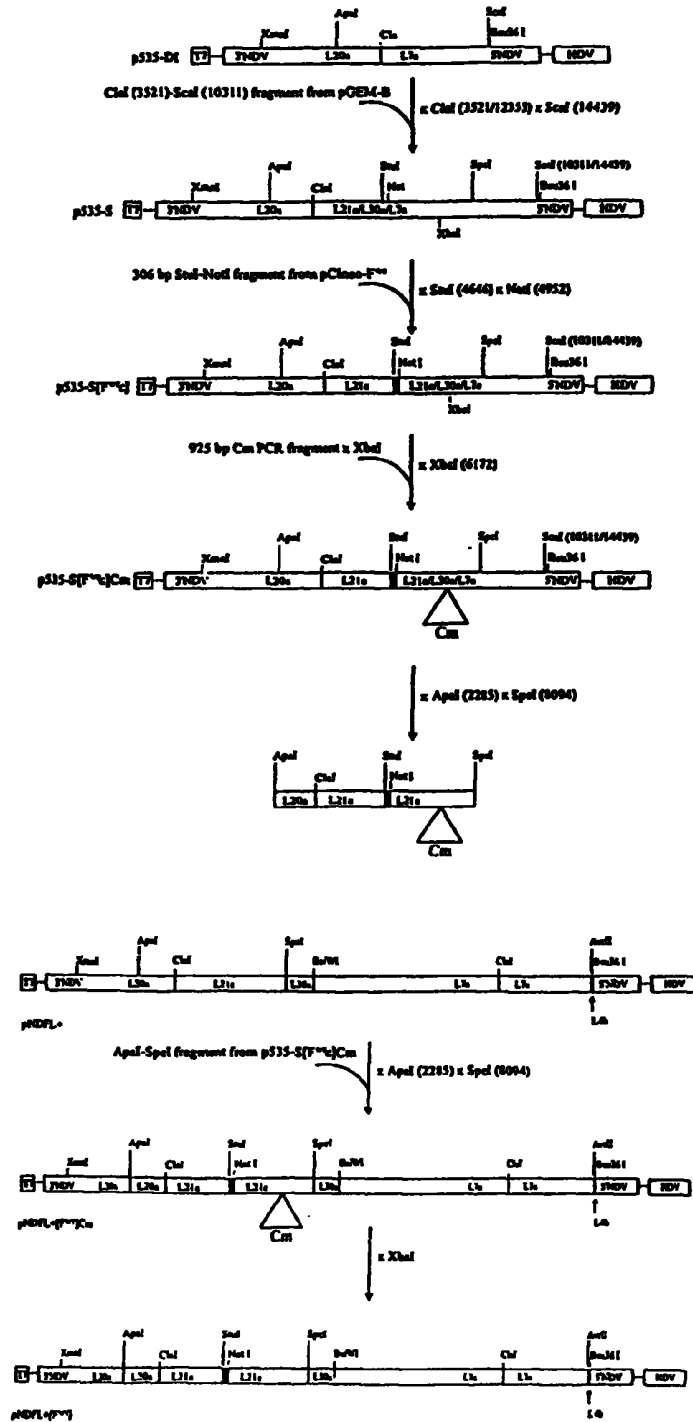


Fig. 4C

20/22

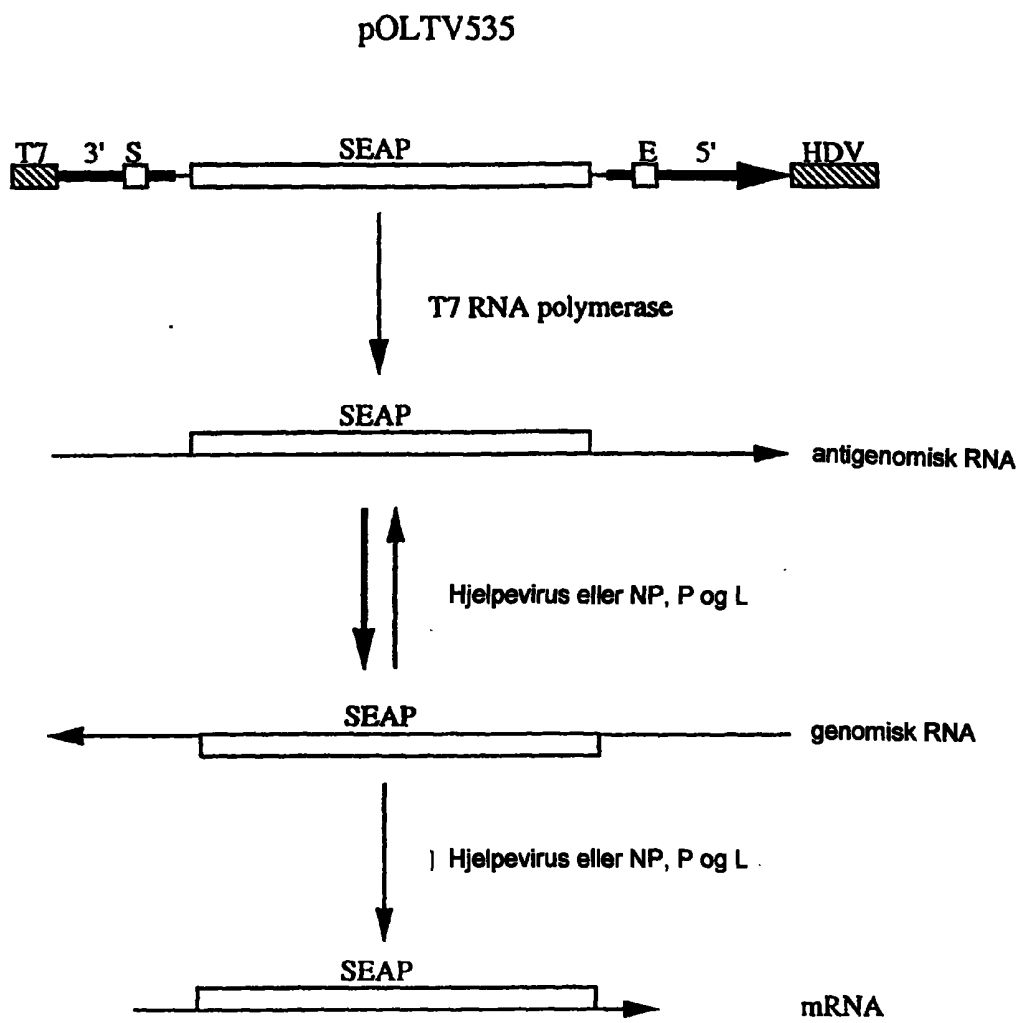


Fig. 5A

21/22

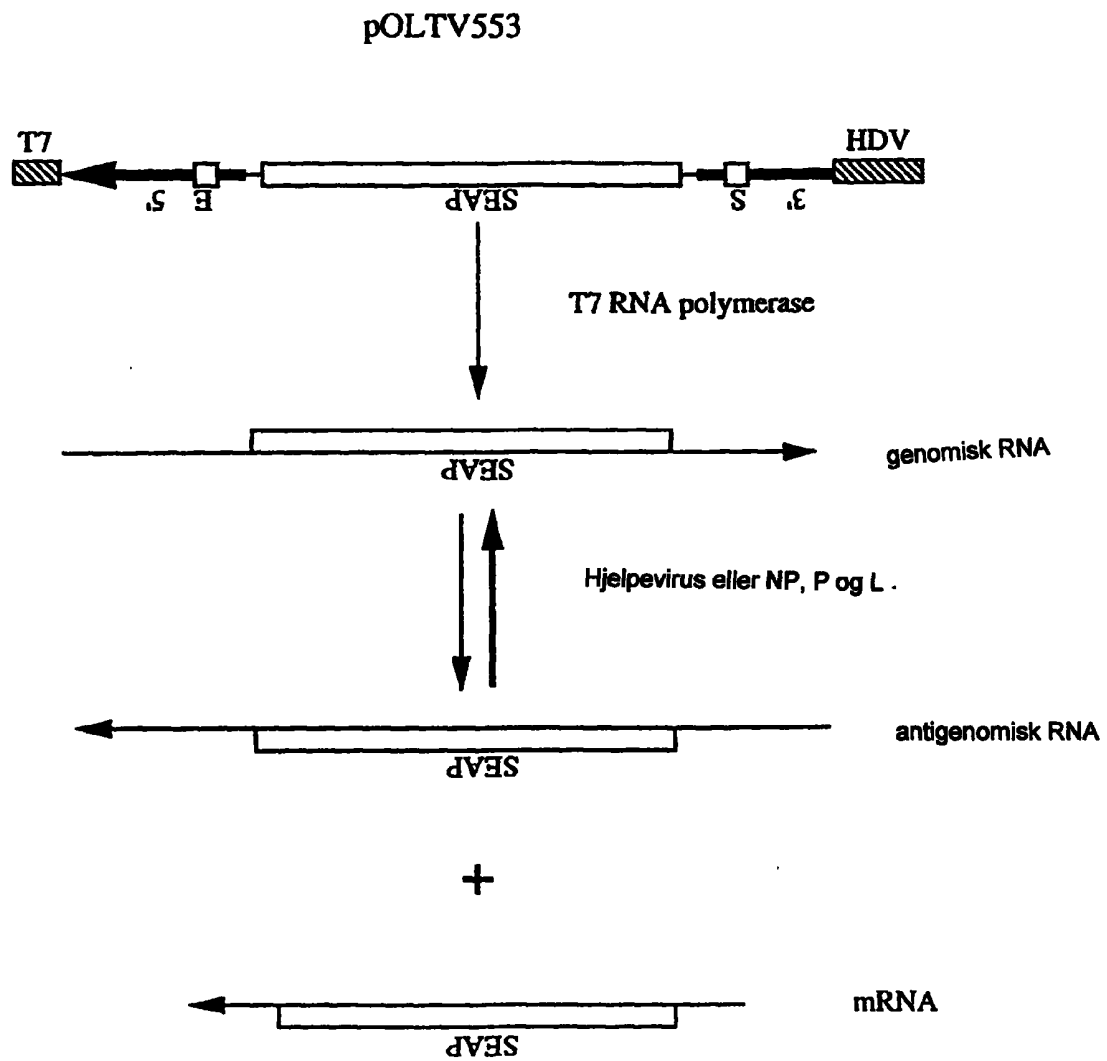


Fig. 5B

<i>Mobillivirus</i>	CDV	1	*	20	*	40	*	60	:
	MeV	2	----	----	----	----	----	----	:
	RDV	3	----	----	----	----	----	----	:
<i>Paramyxovirus</i>	bPIV3	4	----	----	----	----	----	----	:
	hPIV3	5	----	----	----	----	----	----	:
	SeV	6	----	----	----	----	----	AGTAAGAA	8
<i>Rubulavirus</i>	NDV	7	TTAGAAAAAGTTGAACCTGACTCCTTAGGACTCGAATTTCGAATTCGAATCTCAATAAATGTCCTTAAAA	:	64	:			
	hPIV2	8	----	----	----	----	----	----	:
	MuV	9	----	----	----	----	----	----	:
	SV41	10	----	----	----	----	----	----	:
	SV5	11	----	----	----	----	----	----	:
		12	----	----	----	----	----	----	:
<i>Mobillivirus</i>	CDV	13	*	80	*	100	*	120	:
	MeV	14	-----ATACGAAAAAACAACGGTTATTATAAGTTATCATACCCAGCTTTGTCTGGT	:	54	:			
	RDV	15	-----ATTAAAGAAAAAAGTTGAAAAATACGAAAGTTTCTATTCCAGCTTTGTCTGGT	:	51	:			
<i>Paramyxovirus</i>	bPIV3	16	-----ACTAAAGAAAAAAGTTGAAAAATACGAAAGTTTCTATTCCAGCTTTGTCTGGT	:	51	:			
	hPIV3	17	-----AGTAAGAAAAACATATAATATATATATACCAACAGAGTTTCTCTTTGTTGGT	:	55	:			
	SeV	18	-----AGTAAGAAAAACATATAATATATATATACCAACAGAGTTTCTCTTTGTTGGT	:	55	:			
<i>Rubulavirus</i>	NDV	19	AAACTTACAAGAAACAAGAAATTTAAAGGATACATATCTCTTAAACTCTTTGTCTGGT	:	68	:			
	hPIV2	20	AAAGGTGCGCACAAATTATCTTGAGTGTAGTCTCGTCAATTCACCAAAATCTTTGTTGGT	:	124	:			
	MuV	21	-----TTTAAGAAAAAACAATATTGATTTTCCCCTTGGT	:	32	:			
	SV41	22	-----TTAAGAAAAAATTGATTTTCTCTCCCCTTGGT	:	35	:			
	SV5	23	-----TTAAGAAAAAATAATCCGTTCTCTCCCCTTGGT	:	30	:			
		24	-----TTAAGAAAAAAGAGGATTAAATCTTGGTTTTCCTCCCCTTGGT	:	42	:			
					TGGT				

Fig. 6