(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 970352 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 970352

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N 15/38
C12N 7/04
C07K 14/045
A61K 39/245
A61K 48/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **31.07.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **28.01.1997**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **28.01.1997**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **31.07.1995 PCT/US1995/009799**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

29.07.1994 US 282696

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **American Cyanamid Company,** One Cyanamid Plaza, Wayne, NJ 07470-8426, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Jones, Thomas R.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

MHC-luokan I -raskasketjuekspression vähenemiseen osaaottavan ihmisen sytomegaloviruksen geenin tunnistus

Identifiering av en human cytomegalovirusgen som är involverad i minsk ningen av MHC klass I -tungkedsexpression

MHC luokan I -raskasketjuekspression vähenemiseen osaaottavan ihmisen sytomegaloviruksen geenin tunnistus

Keksinnön alue

Esillä oleva keksintö koskee ihmisen sytomegaloviruksen (HCMV) rekombinanttimutanttia, joka ei vähennä solun MHC luokan I -raskasketjuekspressiota infektion aikana, ja kahden ihmisen sytomegalovirusgeenituotteen tunnistusta, jotka riittävät sellaisen vähentämisen aiheuttamiseen.

Keksinnön tausta

Ihmisen sytomegalovirus (HCMV) on beetaherpesvirus, joka aiheuttaa kliinisesti vakavan taudin sellaisissa aikuisissa, joiden immuunireaktiot ovat heikentyneet tai estyneet, kuin myös joissain vastasyntyneissä, jotka ovat infektoituneet kohdussa tai syntymän aikana (Alford ja Britt, 1990). Ihmisen sytomegaloviruksella (HCMV) infektoituneissa soluissa solun pääasiallisen histokompatibiliteettikompleksin (MHC) luokan I -raskasketjuekspressio on vähentynyt. HCMV-viruksen 230 kb pituinen dsDNA-genomi on sekvensoitu (Chee et al., 1990) ja siinä on ainakin 200 avointa lukuraamia (ORF). Useimman näiden 200 geenin toiminta on tuntematon. Tämän patenttihakemuksen tarkoituksia varten avoimen lukuraamin määritellään olevan geenin kohta, joka koodittaa aminohappoketjua ja näin ollen voi koodittaa proteiinia. Joidenkin HCMV-viruksen proteiinien toiminta tunnetaan tai niiden toiminta voidaan ennustaa johtuen niiden homologiasta muiden virus- ja soluproteiinien (erityisesti herpes simplex -viruksen) kanssa. Kuitenkin, suurimmalle osalle HCMV-viruksen ORF-jaksoista niiden koodittamien proteiinien toiminta (toiminnat) on (ovat) tuntematon (tuntemattomia).

HCMV-viruksen geenitoiminnan tutkimiseksi voidaan rakentaa HCMV-deleetiomutantit niiden <u>in vitro</u> kasvuominaisuuksien arvioimiseksi (Jones et al., 1991; Jones ja

Muzithras, 1992). Tämän patenttihakemuksen tarkoituksia varten deleetiomutanttien määritellään olevan ihmisen sytomegaloviruksen mutantteja, joista puuttuu villityypin virusgenomin alueita. Tämä strategia pitää sisällään valittujen (valitun) HCMV-geenien (HCMV-geenin) kohdennetun korvausmutageneesin prokaryoottisella reportterigeenillä, tavallisesti ß-glukuronidaasilla, vaikka guanosiinifosforibosyylitransferaasia voidaan myös käyttää. Tällä tavalla rekombinanttivirus voidaan eristää ainoastaan silloin, jos korvattu virusgeeni (korvatut virusgeenit) ei ole (eivät ole) elintärkeä (elintärkeitä).

Useat tutkijat ovat osoittaneet, että HCMV-infektio johtaa solun MHC luokan I -raskasketjuekspression vähenemiseen (Browne et al., 1990; Beersma et al., 1993; Yamashita et al., 1993). Tämän patenttihakemuksen tarkoituksia varten määrän vähenemisen määritetään olevan väheneminen MHC luokan I -raskasketjujen joko synteesissä, stabiilisuudessa tai pintaekspressiossa. Sellainen ilmiö on raportoitu joidenkin muiden DNA-virusten kohdalla sisältäen adenoviruksen, hiiren sytomegaloviruksen ja herpes simplex -viruksen (Anderson et al., 1985; Burget ja Kvist, 1985; del Val et al., 1989; Campbell et al., 1992; Campbell ja Slater, 1994; York et al., 1994). Adenovirus- ja herpes simplex -virussysteemeissä virusgeenin tuote, joka ei ole korvaamaton <u>in vitro</u> replikaatiota varten, riittää aiheuttamaan MHC luokan I -raskasketjuekspression vähenemisen (Anderson et al., 1985; Burget ja Kvist, 1985). Hiiren sytomegaloviruksen geeniä (geenejä), joka (jotka) ottaa (ottavat) osaa luokan I -raskasketjuproteiiniekspression vähenemiseen, ei ole vielä tunnistettu.

Keksinnön yhteenveto

Esillä oleva keksintö esittää ihmisen sytomegaloviruksen rekombinanttimutantin, joka ei vähennä solun MHC luokan I -raskasketjuekspressiota infektion aikana. Syto-

megaloviruksen (HCMV) rekombinanttimutantin genomista on deletoitu alue, joka sisältää avoimen lukuraamin US2.

Esillä oleva keksintö esittää myös menetelmän pääasiallisen histokompatibiliteettikompleksin (MHC) luokan I ekspression vähentämisen kontrolloimiseksi sytomegaloviruksella infektoituneessa solussa, joka sisältää vaiheen, jossa käytetään ihmisen sytomegaloviruksen rekombinanttimutanttia.

Esillä oleva keksintö esittää myös rokotteen, jossa käytetään ihmisen sytomegaloviruksen rekombinanttimutanttia, kuin myös menetelmän, jolla yksilö immunisoidaan sytomegalovirusta vastaan, joka sisältää vaiheen, jossa käytetään ihmisen sytomegaloviruksen rekombinanttimutanttia. Elävä heikennetty HCMV-rokote, josta tämä avoimen lukuraamin US2 -geenialue puuttuu, muodostaa paremman immuunivasteen kuin sellainen rokote, joka sisältää tämän geenialueen, joka perustuu siihen, että edellinen ei kykene vähentämään luokan I ekspressiota. Sen vuoksi virus, jolta tämä alue puuttuu, on ylivoimainen immunogeeni.

Esillä oleva keksintö esittää myös menetelmän, jolla estetään tai vähennetään yksilön herkkyyttä akuutille sytomegalovirukselle, joka sisältää vaiheen, jossa annetaan immunogeeninen määrä ihmisen sytomegaloviruksen rekombinanttimutanttia.

Esillä oleva keksintö esittää myös geeniterapiavektorin, jossa avoimen lukuraamin US2 HCMV -geeni, joka ottaa osaa MHC luokan I -raskasketjuekspression vähenemiseen, voidaan sijoittaa adenovirusvektoreihin tai samanlaisiin virusperusteisiin geeniterapiavektoreihin niin, että minimoidaan immuunivaste. Tämä sallii rekombinanttiadenoviruksen tai samanlaisten virusperusteisten geeniterapiavektoreiden käytön geeniterapiassa.

Keksintö on täydellisemmin ymmärrettävissä seuraavien kuvioiden valossa.

Kuvioiden lyhyt kuvaus

Kuvio 1 osoittaa rekombinanttivirusgenomien organisaation. Kuvion 1A ensimmäinen linja on kaavio HCMV-viruksen villityypin genomin kokonaisorganisaatiosta. Uniikkialuesekvenssit on osoitettu viivalla, kun taas toistoaluesekvenssit on osoitettu varjostetuilla laatikoilla. Asiaankuuluvat HindIII-fragmentit L- ja S-komponenttien sisällä on osoitettu kirjainmerkillä (Orem et al., 1982). Toinen linja on laajennus villityypin S-komponentin HindIII-Q-, X- ja V-alueista. Merkittävät avoimet lukuraamit ja niiden orientaatio on esitetty avoimilla laatikoilla (Chee et al., 1990). IR_S-toistosekvenssien sijainti on esitetty varjostetulla suorakulmiolla. HindIII-(H) ja XhoI-restriktioendonukleaasikohdat (X) on osoitettu. Kuviot 1B - I esittävät osoitetun HCMV-mutantin genomisen organisaation. Kussakin tapauksessa ensimmäinen linja on villityypin AD169-emokannan genomin organisaatio, toinen linja edustaa sen linearisoidun plasmidin asiaankuuluvien sekvenssien organisaatiota, jota käytettiin rekombinanttiviruksen valmistuksessa. Vinoviivoitetut linjat osoittavat niitä viruksen viereisiä sekvenssejä, jotka voivat ottaa osaa homologiseen rekombinaatioon, jolla haluttu mutaatio muodostetaan. Deletoitu alue on osoitettu varjostetulla laatikolla ensimmäisen linjan alapuolella. Kuvio 1J esittää RV799-mutantin alkuperän ja organisaation. Ensimmäiset kaksi linjaa edustavat samoja asioita kuin kuvioissa 1B - I, kolmas linja edustaa sen linearisoidun plasmidin asiaankuuluvien sekvenssien organisaatiota, jota käytettiin RV799-mutantin valmistamiseksi RV134-emokannasta (toinen linja). Restriktiokohdat ovat: ApaI (A), AatII (Aa), BsmI (Bs), HindIII (H), HpaI (Hp), NarI (Na), NcoI (Nc), NheI (Nh), PstI (P), SalI (S), SauI (Sa), SphI (Sp), SstI (T1), SstII (T2), XbaI (Xb) ja XhoI (X).

Kuvio 2 osoittaa rekombinanttivirusgenomien organisaation. Kuvion 2A ensimmäinen linja on kaavio HCMV-

viruksen villityypin genomin kokonaisorganisaatiosta. Uniikkialuesekvenssit on osoitettu viivalla, kun taas toistoaluesekvenssit on osoitettu varjostetuilla laatikoilla. Asiaankuuluvat HindIII-fragmentit L- ja S-komponenttien sisällä on osoitettu kirjainmerkillä (Orem et al., 1982). Toinen linja on laajennus villityypin S-komponentin HindIII-Q-, X- ja V-alueista. Merkittävät avoimet lukuraamit ja niiden orientaatio on esitetty avoimilla laatikoilla (Chee et al., 1990). IR_S-toistosekvenssien sijainti on esitetty varjostetulla suorakulmiolla. HindIII-(H) ja XhoI-restriktioendonukleaasikohdat (X) on osoitettu. Kuviot 2B ja 2C esittävät osoitetun HCMV-mutantin genomisen organisaation. Kussakin tapauksessa ensimmäinen linja on villityypin AD169-emokannan genomin organisaatio, toinen linja edustaa sen linearisoidun plasmidin asiaankuuluvien sekvenssien organisaatiota, jota käytettiin rekombinanttiviruksen valmistuksessa. Vinoviivoitetut linjat osoittavat niitä viruksen viereisiä sekvenssejä, jotka voivat ottaa osaa homologiseen rekombinaatioon, jolla haluttu mutaatio muodostetaan. Deletoitu alue on osoitettu varjostetulla laatikolla ensimmäisen linjan alapuolella. Restriktiokohdat ovat: EcoRV (RV), HindIII (H), KpnI (K), PstI (P), SacI (Sa), SmaI (Sm), XbaI (Xb) ja XhoI (X). Suluissa olevia kohtia ei enää ole rekombinanttiviruksessa.

Kuvio 3 esittää solupinnan MHC luokan I -proteiinien tunnistuksen immunofluoresenssivirtaussytometrialla HCMV-infektoituneissa soluissa. Ihmisen esinahan fibroblastisolut (HFF) infektoitiin osoitetulla viruksella niin, että infektiomonikerta oli 5 PFU:ta/solu, 72 tunnin ajan. Siinä aikapisteessä solut fiksattiin 1 % paraformaldehydillä ja värjättiin primaarisella vasta-aineella, joka oli spesifinen HLA-A-, B-, C-proteiineille (W6/32), tai hiiren verrokki-IgG-proteiinilla (isotyypin suhteen yhteensopiva), jonka jälkeen suoritettiin käsittely sekun-

daarisella FITC-konjugoidulla vuohen anti-hiiri-IgG-proteiinilla. Positiivisten solujen prosenttimäärä (kokonaismäärä 5 x 10^3) ja keskimääräinen fluoresenssin voimakkuus (MFI) laskettiin perustuen eteenpäin suuntautuvan valon sironnan määrään verrattuna logaritmisesti integroituun 90° valon sironnan määrään käyttäen Immuno Program -ohjelmaa Coulter MDADS I -laitteessa.

Kuvio 4 osoittaa MHC luokan I -raskasketjuekspression HCMV-villityypin kannalla AD169 infektoituneissa soluissa. Kuvio 4A on Western blot -analyysi. HFF-solut eivät olleet infektoituneita (U) tai ne oli infektoitu infektiomonikerta-arvolla 5 PFU:ta/solu. 24, 48 ja 72 tuntia infektion jälkeen kerättiin solun kokonaisproteiinit, ne ajettiin elektroforeesissa 15 % SDS-polyakryyliamidigeelissä, siirrettiin sähköisesti nitroselluloosalle ja värjättiin hiiren monoklonaalisella vasta-aineella TP25.99 (spesifinen MHC luokan I -raskasketjujen ei-konformationaaliselle epitoopille) käyttäen ECL-kemiluminesenssitunnistuskäyttöpakkausta (Amersham). Kuviot 4B ja 4C ovat immuunisaostusanalyysejä. HFF-solut eivät olleet infektoituneita tai ne oli infektoitu (kuten yllä) niin, että läsnä oli fosfonoformaattia (+PFA) tai sitä ei ollut, ja niitä leimattiin radioaktiivisesti joko neljä tuntia myöhään infektion jälkeen (69 - 73 tuntia) (kuvio 4B) tai kaksi tuntia osoitettuna aikana infektion jälkeen (kuvio 4C). Proteiinit kerättiin juuri radioaktiivisuusleimauksen jälkeen ja luokan I -raskasketjut immuunisaostettiin käyttäen hiiren monoklonaalista vasta-ainetta TP25.99.

Kuvio 5 esittää raskasketjuekspression analyysin soluissa, jotka on infektoitu HCMV-mutanteilla. HFF-soluja ei infektoitu (U) tai ne infektoitiin osoitetulla viruksella (infektiomonikerralla 5 PFU:ta/solu) ja leimattiin radioaktiiviseksi neljän tunnin ajan myöhään infektion jälkeen (69 - 73 tuntia). Proteiinit kerättiin juuri radioaktiivisuusleimauksen jälkeen. Kuvio 5A on autoradio-

grafiakuva luokan I -raskasketjuista, jotka immuunisaostettiin käyttäen hiiren monoklonaalista vasta-ainetta TP25.99. Kuvio 5B on autoradiografiakuva radioaktiiviseksi leimatuista kokonaisproteiineista, jotta voitiin määrittää radioaktiivisuusleimaustehokkuuden ekvivalenssi suurinpiirtein. Kuvio 5C on autoradiografiakuva, jolla määritettiin se, että viruksen replikaatiosykli edistyi yhtäläisesti. UL80-proteiinit immuunisaostettiin käyttäen kanin polyklonaalista anti-asennusproteiinin antiseerumia.

Kuvio 6 esittää luokan I -raskasketjujen immuunisaostuksen soluista, jotka on infektoitu RV798-, RV799-, RV134-mutanttiviruksilla tai AD169-villityypin viruksella. HFF-soluja ei infektoitu (U) tai ne infektoitiin osoitetulla viruksella (infektiomonikerta-arvolla 5 PFU:ta/solu) ja leimattiin radioaktiiviseksi kahden tunnin ajan myöhään infektion jälkeen (71 - 73 tuntia). Proteiinit kerättiin juuri radioaktiivisuusleimauksen jälkeen. Kuvio 6A on autoradiografiakuva luokan I -raskasketjuista, jotka immuunisaostettiin käyttäen hiiren monoklonaalista vasta-ainetta TP25.99. Radioaktiivisuusleimaustehokkuuden ekvivalenssi (kuvio 6B) ja edistyminen viruksen replikaatiosyklin läpi (kuvio 6C) määritettiin, kuten on kuvattu kuvioissa 5B ja 5C.

Kuvio 7 on autoradiografiakuva, joka esittää RV798-mutantilla infektoituneissa soluissa syntetisoitujen luokan I -raskasketjujen herkkyyden endoglykosidaasi H -entsyymille. HFF-solut infektoitiin RV798-viruksella (infektiomonikerta-arvolla 5 PFU:ta/solu) ja ne leimattiin radioaktiiviseksi kahden tunnin ajan aikaisin (6 - 8 tuntia) tai myöhään (80 - 82 tuntia) infektion jälkeen. Vertailutarkoituksia varten infektoimattomia soluja leimattiin kahden tunnin ajan. Proteiinit kerättiin joko juuri radioaktiivisuusleimauksen (pulssi) tai täydellisessä leimattomassa alustassa tapahtuneen kahden tunnin kylmäleimauksen (kylmäleimaus) jälkeen. Luokan I -raskasketjut immuuni-

saostettiin käyttäen hiiren monoklonaalista vasta-ainetta TP25.99. Immuunisaostettuja proteiineja inkuboitiin kuusi tuntia niin, että läsnä oli (+) 1,5 mU endoglykosidaasi H -proteiinia tai sitä ei ollut (-), ennen SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesia ja fluorografiaa.

Kuvio 8 esittää luokan I -raskasketjujen immuunisaostuksen soluista, jotka on infektoitu RV798-, RV7181-, RV7177-mutanttiviruksilla tai AD169-villityypin viruksella. HFF-soluja ei infektoitu (U) tai ne infektoitiin osoitetulla viruksella (infektiomonikerta-arvolla 5 PFU:ta/solu) ja leimattiin radioaktiiviseksi kahden tunnin ajan myöhään infektion jälkeen (65 - 67 tuntia). Proteiinit kerättiin juuri radioaktiivisuusleimauksen jälkeen. Kuvio 8A on autoradiografiakuva luokan I -raskasketjuista, jotka immuunisaostettiin käyttäen hiiren monoklonaalista vasta-ainetta TP25.99. Radioaktiivisuusleimaustehokkuuden ekvivalenssi (kuvio 8B) ja edistyminen viruksen replikaatiosyklin läpi (kuvio 8C) määritettiin, kuten on kuvattu kuvioissa 5B - C.

Kuvio 9 on yhteenveto MHC luokan I -raskasketjuekspressiotuloksista HFF-soluista, jotka on infektoitu villityypin HCMV-viruksella HCMV-mutantilla. Ensimmäinen linja on HCMV-villityypin genomin kokonaisorganisaatio ja toinen linja on villityypin S-komponentin HindIII-Q- ja X-alueiden laajennus. ORF-alueet on osoitettu varjostamattomalla suorakulmiolla; leimaamaton ORF, joka menee päällekkäin US4- ja US5-alueiden kanssa, on US4.5. Eri HCMV-mutanttien deleetiot on esitetty varjostetulla suorakulmiolla. RV670-mutantista on deletoitu IRS1 - US9 ja US11; RV35-mutantista on deletoitu US6 - US11; RV67-mutantista on deletoitu US10 - US11; RV80-mutantista on deletoitu US8 - US9; RV725-mutantista on deletoitu US7; RV69-mutantista on deletoitu US6; RV47-mutantista on deletoitu US2 - US3; RV5122-mutantista on deletoitu US1; RV46-mutantista on deletoitu IRS1; RV798-mutantista on deletoitu US2 -

US11; RV7181-mutantista on deletoitu IRS1 - US9; RV7177-mutantista on deletoitu IRS1 - US6 ja RV7186-mutantista on deletoitu IRS1 - US11. MHC luokan I -raskasketjuekspression vähentymistulokset ovat peräisin immuunisaostuskokeista (käyttäen raskasketjun konformaatiosta riippumatonta monoklonaalista vasta-ainetta TP25.99), joissa HCMV-infektoituja HFF-soluja leimattiin radioaktiiviseksi myöhään infektion jälkeen. Viimeinen linja osoittaa niiden kahden osa-alueen sijainnin, jotka sisältävät geenin (geenit), joka (jotka) riittää (riittävät) MHC luokan I -raskasketjuekspression vähentämiseen. Osa-alue A sisältää ORF-alueet US2 - US5 (emäkset 193119 - 195607) ja osa-alue B sisältää ORF-alueet US10 ja US11 (emäkset 199083 - 200360).

Kuviot 10A - D ovat valokuvia, jotka esittävät US11-geenituotteen (gpUS11) sijainnin infektoituneissa soluissa immunofluoresenssilla. HFF-soluja ei infektoitu tai ne infektoitiin joko AD169-villityypin viruksella tai RV699-mutantilla (US11-geeni deletoitu) niin, että infektiomonikerta oli 5 PFU:ta/solu. Kahdeksan tunnin kuluttua infektoimattomat ja infektoidut solut fiksattiin 4 % paraformaldehydillä. Sitten jotkin solut tehtiin läpäiseviksi 0,2 % Triton X-100-detergentillä. Primaarinen vasta-aine oli kanin polyklonaalinen antiseerumi, joka oli tehty US11-fuusioproteiinia vastaan (Jones ja Muzithras, 1991). Fluoresenssia tarkasteltiin silmin Zeiss-mikroskoopilla.

Kuvio 11 esittää MHC luokan I -raskasketjujen immuunisaostuksen soluista, jotka on infektoitu villityypin HCMV-viruksella ja HCMV-mutanteilla. HFF- tai U373-MG-soluja ei infektoitu (U) tai ne infektoitiin osoitetulla viruksella (infektiomonikerta-arvo oli 5 tai 3 PFU:ta/solu, vastaavasti) ja leimattiin radioaktiivisiksi neljän tunnin ajan osoitettuna aikana infektion jälkeen. Infektoituneiden solujen proteiinit uutettiin välittömästi radioaktiivisuusleimauksen jälkeen ja altistettiin immuunisaostukselle monoklonaalisella anti-ihmis MHC luokan I

-raskasketju-vasta-aineella TP25.99. HFF-solut leimattiin radioaktiivisiksi joko aikaisin (kuvio 11A) tai myöhään (kuvio 11B) infektion jälkeen. U373-MG-solut leimattiin radioaktiivisiksi myöhään infektion jälkeen (kuvio 11C). AD169 on HCMV-viruksen villityypin kanta, josta deleetiomutanttivirukset ovat peräisin. RV699-mutantista on deletoitu ainoastaan US11-geeni; RV35-mutantista on deletoitu geenit US6 - US11; RV8146-mutantista on deletoitu geenit US4 - US11; RV8173-mutantista on deletoitu geenit US3 - US11; ja RV798-mutantista on deletoitu geenit US2 - US11.

Kuvio 12 on yhteenveto MHC luokan I -raskasketjuekspressiotuloksista HFF-soluista, jotka on infektoitu villityypin HCMV-viruksella HCMV-mutantilla. Ensimmäinen linja on HCMV-villityypin genomin kokonaisorganisaatio ja toinen linja on villityypin S-komponentin HindIII-Q- ja X-alueiden laajennus. ORF-alueet on osoitettu varjostamattomalla suorakulmiolla; leimaamaton ORF, joka menee päällekkäin US4- ja US5-alueiden kanssa, on US4.5. Niiden lokuksien sijainti, jotka sisältävät geenin (geenit), joka (jotka) riittää (riittävät) MHC luokan I -raskasketjuekspression vähentämiseen, on osoitettu mustilla suorakulmioilla. Yksi lokus sisältää ORF-alueet US2 - US5 (emäkset 193119 - 195607) ja toinen lokus on US11 (emäkset 199716 - 200360). Eri HCMV-mutanttien deleetiot on esitetty varjostetulla suorakulmiolla. AD169 on villityypin kanta eikä siinä ole deleetioita; RV798-mutantista on deletoitu US2 - US11; RV699-mutantista on deletoitu ainoastaan US11; ja RV35-mutantista on deletoitu US6 - US11. RV8146-mutantista on deletoitu US4 - US11 ja RV8173-mutantista on deletoitu US3 - US11. MHC luokan I -raskasketjuekspression vähentymistulokset ovat peräisin immuunisaostuskokeista käyttäen konformaatiosta riippumatonta monoklonaalista anti-ihmis MHC luokan I -raskasketju-vasta-ainetta TP25.99 ja metabolisesti radioaktiivisiksi leimattuja proteiineja soluis-

ta, jotka oli infektoitu villityypin HCMV-viruksella tai HCMV-mutantilla.

Kuvio 13 esittää RNA- ja proteiinieksPression US2-geenistä. Kaikissa kuvioissa 13A - D kuvatuissa kokeissa infektiomonikerta oli 5. Kuvioita 13A ja 13B varten solun kokonais-RNA kerättiin infektoimattomista (U) tai infektoiduista HFF-soluista osoitettuna aikana infektion jälkeen (h p.i.), ajettiin elektroforeesissa 1,2 % agaroosissa, siirrettiin nailonmembraaneille ja hybridisoitiin US2-spesifisen yksijuosteisen ribokoettimen kanssa (se on, Northern blot -analyysi). Solut infektoitiin joko HCMV-viruksen villityypillä (AD169) tai US11 - US2-deleetiomutantilla RV798, kuten on osoitettu. 72 h p.i. -RNA-näyte RV798-mutantilla infektoiduista soluista (kuvio 13B, kaista 7) sisällytettiin negatiiviverrokkina ja sen vuoksi antaa keinon validoida se pieni määrä 0,9 kb pituista US2 mRNA -molekyyliä, joka tunnistettiin 72 h p.i. -näytteessä AD169-infektiosta (kuvio 13B, kaista 6). Kuviota 13C varten ajettiin solun kokonaisproteiinit infektoimattomista (U) tai HCMV-villityypin kannalla (AD169) infektoiduista HFF-soluista elektroforeesissa osoitetussa h p.i. -pisteessä 15 % SDS-PAGE-geelissä, siirrettiin nitroselluloosamembraaneille ja värjättiin polyklonaalisella anti-US2-antiseerumilla (se on, Western blot -analyysi). Noin 24 kDa kokoisen US2-alueen koodittaman proteiinin (pUS2) sijainti on osoitettu. Kuviota 13D varten suoritettiin Western blot -analyysi HCMV-villityypin viruksella ja HCMV-mutantilla infektoiduista soluista, kuten on kuvattu kuviota 13C varten paitsi, että kaikki infektoituneiden solujen proteiinit kerättiin aikapisteessä 11 h p.i.

Kuvio 14 esittää raskasketjuekspression analyysin lyhyen aikaa infektion jälkeen soluissa, jotka on infektoitu HCMV-mutanteilla. HFF-soluja ei infektoitu (U) tai ne infektoitiin osoitetulla viruksella (infektiomonikerta oli 5 PFU:ta/solu) ja leimattiin radioaktiivisiksi neljän tun-

nin ajan 6 - 10 tuntia infektion jälkeen. Proteiinit kerättiin juuri radioaktiivisuusleimauksen jälkeen. Kuvio 14A on autoradiografiakuva luokan I -raskasketjuista, jotka immuunisaostettiin käyttäen hiiren monoklonaalista vasta-ainetta TP25.99. Kuvio 14B on autoradiografiakuva, jossa yhtäläisen infektion summittaiseksi määrittämiseksi 72 kDa erittäin aikainen IE1-proteiini immuunisaostettiin käyttäen hiiren monoklonaalista vasta-ainetta 9221. Kuvio 14C on autoradiografiakuva solun transferriinireseptorin immuunisaostamisesta hiiren monoklonaalisella vasta-aineella Ber-T9 tämän glykoproteiinin suurinpiirtein yhtäläisen ekspression määrittämiseksi. Kuvio 14D on autoradiografiakuva radioaktiiviseksi leimatuista kokonaisproteiineista, jolla määritettiin suurinpiirtein ekvivalentti radioaktiivisuusleimaustehokkuus.

Kuviot 15A - B ovat Western blot -analyysejä solulinjoista, jotka ekspressoivat HCMV US11-geeniä. Infektoimattomia ihmisen U373-MG-astrosytoomasoluja, jotka oli stabiilisti transformoitu US11-ekspressioplasmidilla, analysoitiin Wwestern blot -analyysillä MHC luokan I -raskasketjuekspression suhteen (kuvio 15A) ja US11-ekspression suhteen (kuvio 15B) käyttäen monoklonaalista vasta-ainetta TP25.99 ja polyklonaalista US11-antiseerumia, vastaavasti.

Kuvio 16 esittää stabiilisti transfektoituneiden solujen proteiinien Western blot -analyysin. Kokonaisproteiiniuutokset joko U373-MG-emosoluista tai stabiilisti transfektoituneista soluista (55-sarja) ajettiin elektroforeesissa ja siirrettiin membraanille, kuten on kuvattu kuviota 13C varten. Blotti leikattiin horisontaalisesti niin, että se osa blotista, joka sisälsi MHC luokan I -raskasketjut (HC), analysoitiin käyttäen monoklonaalista raskasketju-vasta-ainetta TP25.99 (kuvio 16A), ja se osa blottia, joka sisälsi US2-alueen koodittaman proteiinin (pUS2), analysoitiin käyttäen polyklonaalista US2-vasta-ainetta (kuvio 16B). 55 - 212 ja 55 - 215 ovat negatiivi-

sia solulinjoja. Solulinja 55 - 302, vaikka onkin transfektoitu US2-ekspressioplasmidilla, ei ekspressoi tunnistettavia määriä pUS2-proteiinia. Solulinjat 55 - 303, 55 - 304 ja 55 - 310 ekspressoivat helposti tunnistettavia määriä pUS2-proteiinia. Kumulatiiviset tulokset osoittavat käänteisen suhteen pUS2-proteiinin ja MHC luokan I -raskasketjujen välillä.

Kuvio 17 esittää luokan I -raskasketjujen epästabiiliuden pUS2-proteiinin läsnäollessa. Kuviossa 17A HFF-solut infektoitiin RV35-mutantilla (josta on deletoitu US11 - US6; US2 on jäljellä) infektiomonikerta-arvolla 5. Kolme vuorokautta infektion jälkeen solut pulssileimattiin 0,5 tunnin ajan ja infektoituneiden solujen proteiinit joko kerättiin välittömästi (P) tai ne kerättiin kylmäleimausjakson jälkeen, joka oli pituudeltaan joko 0,5, 1, 2 tai 3 tuntia leimattomassa alustassa. Raskasketjut (HC) immuunisaostettiin käyttäen monoklonaalista vasta-ainetta TP25.99. Luokan I -raskasketjujen puoli-ikä RV35-mutantilla infektoituneissa soluissa on noin 0,5 tuntia. Tälle päinvastoin rinnakkaiskokeet, joissa käytettiin infektoimattomia tai RV798-mutantilla infektoituja soluja (ei esitetty) osoittivat, että raskasketjuilla oli pidempi puoli-ikä kuin kolme tuntia. Kuviossa 17B suoritettiin samanlaiset radioaktiivisuuspulssi-kylmäleimaus-immuunisaostuskokeet U373-MG-emosoluilla tai stabiilisti transfektoiduilla solulinjoilla 55 - 212 ja 55 - 310. Toisin kuin 55 - 310-solulinja, joka ekspressoi helposti tunnistettavia määriä pUS2-proteiinia, eivät U373-MG-solut eivätkä 55-212-solulinja ekspressoi pUS2-proteiinia. Luokan I -raskasketjut ovat stabiileja soluissa, jotka eivät ekspressoi US2-aluetta, mutta niillä on lyhyt puoli-ikä pUS2-proteiinia ekspressoivissa soluissa (se on, 55 - 310). Kuviossa 17C käytettiin samoja pulssi-kylmäleimausuutoksia kuin kuviossa 17B verrokki-immuunisaostuksia varten monoklonaalisella vasta-aineella Ber-T9, joka on spesifinen toiselle

solun glykoproteiinille, transferriinireseptorille (TfR). Kaikissa kolmessa solulinjassa transferriinireseptorin stabiilisuus ja prosessointi on samanlainen.

Suositeltavien suoritustapojen kuvaus

On rakennettu HCMV-rekombinanttimutantti, jonka nimi on RV670, joka ekspressoi merkkigeeniä (ß-glukuronidaasi) virusgeeniryhmän tilalla (Jones ja Muzithras, 1992). Kun infektoidaan ihmisen fibroblastisolut tällä mutantilla, pääasiallisen histokompatibiliteettikompleksin (MHC) luokan I -raskasketjujen ekspressio ei alene niin kuin se tekee, kun villityypin HCMV infektoi nämä solut.

Toisin kuin villityypin HCMV, esillä olevan keksinnön virus ei johda solun MHC luokan I -raskasketjuproteiinieksPression vähenemiseen. Yllättävästi on havaittu, että HCMV-genomin 7 kb pituinen alue sisältää geenit, joita tarvitaan raskasketjuekspression vähentämiseen, ja niitä on käytetty keksinnössä. Kuten alla on kuvattu yksityiskohtaisemmin, tällä 7 kb pituisella alueella on kaksi HCMV-viruksen geneettistä lokusta, jotka toisistaan riippumattomasti riittävät MHC luokan I -raskasketjuekspression vähentämiseen. US11-geeni on yksi sellainen lokus ja toinen lokus on US2 - US5-geenien osa-alue (se on, osa-alue A). Molemmat näistä lokuksista ovat 7 kb pituisen alueen sisällä HCMV-genomissa alueen US2 - US11 välissä, ne mukaanluettuna, joka on deletoitu rekombinanttiviruksesta RV798 (kuviot 9 ja 12). Vastaavasti RV798-mutantilla infektoidut solut eivät vähennä MHC luokan I -raskasketjuekspressiota. Muiden määriteltyjen HCMV-mutanttien rakentamisella ja analyysillä on yhden lokuksen havaittu olevan määritelty US11-geenin toimesta, joka varmistettiin muilla tutkimuksilla. US11 ekspressoitui konstitutiivisesti vaihtelevina tasoina useissa stabiilisti transfektoituneissa solulinjoissa. Näiden solulinjojen proteiinieksPression analyysi osoitti, että US11-geenin ekspressio korreloi käänteisesti MHC luokan I -raskasketjuekspression

suhteen. Sen jälkeen on havaittu, että HCMV-geeni toisessa lokuksessa (US2 - US5), joka riittää MHC luokan I -raskasketjuekspression vähentämiseen, on US2.

Alan asiantuntija ymmärtää, että tehokas antigeenin prosessointi ja ilmeneminen tarvitaan sytotoksisten T-lymfosyyttiesiasteiden aktivoimikseksi ja lisäämiseksi tehokasta soluvälitteistä immuunivastetta varten. Tehokas virusantigeenin ilmeneminen vaatii jatkuvaa MHC luokan I -proteiinien ekspressiota läpi infektion. Solujen infektio RV670-mutantilla johtaa jatkuvaan MHC luokan I -raskasketjujen ekspressioon.

Alan asiantuntija ymmärtää, että virusta (RV670) tai muuta ihmisen sytomegalovirusta, jolla on samanlaisten geenien deleetio (esim. RV798), voidaan käyttää tehokkaan elävän rokotteen valmistamiseksi, koska luokan I -raskasketjuja ekspressoidaan yhä RV670-infektoiduissa soluissa niin kuin niitä ekspressoidaan infektoimattomissa soluissa, ja sen vuoksi tapahtuu virusantigeenin ilmeneminen sytotoksisen T-soluvasteen aloitustarkoituksia varten.

Esillä olevassa keksinnössä virtaussytometria- ja immunofluoresenssikokeet vahvistivat, että luokan I -raskasketjujen solupintaekspressio on suuresti alentunut HCMV-villityypin kannalla AD169 infektoituneissa HFF-soluissa myöhään infektion jälkeen. Radioaktiivisuusleimausimmuunisaostuskokeet osoittivat, että juuri syntetisoitujen MHC luokan I -raskasketjujen väheneminen tapahtui läpi koko infektion alkaen hyvin aikaisessa vaiheessa infektion jälkeen (kolme tuntia) (kuvio 4C). Tämän alenemisen on julkaistu tapahtuvan translaation jälkeisellä tasolla: luokan I -raskasketjuilla on korkeampi turnover-nopeus HCMV-infektoituneissa soluissa kuin infektoitumattomissa soluissa (Beersma et al., 1993). Sellainen luokan I -raskasketjujen epästabiilisuus johtaa alentuneeseen soluvälitteiseen immuunivasteeseen HCMV-infektiota vastaan, koska viruspeptidit ilmennetään tehottomasti. Näin ollen luo-

kan I -raskasketjuekspression aleneminen on tärkeää, mitä tulee välttymiseen isännän immuunisysteemiltä, kun HCMV muodostaa jatkuvan tai latentin infektion (Gooding, 1992).

HCMV-mutanttipankkia, joka edustaa 18 sellaista ORF-aluetta, jotka eivät ole elintärkeitä viruksen replikoitumiselle kudosviljelmässä, seulottiin niiden kyvyn suhteen saada aikaan MHC luokan I -raskasketjuekspression väheneminen. HCMV-genomin S-komponentin 7 kb pituisen alueen, joka sisältää ORF-alueet US2 - US11 (emäkset 193119 - 200360), osoitettiin selvästi sisältävän geenit, joita tarvitaan tätä fenotyyppiä varten (tuloksista on yhteenveto kuviossa 9). Tällä alueella on kaksi osa-aluetta, joista kumpikin sisältää geenit, jotka riittävät raskasketjuekspression vähentämiseen.

Osa-alue A sisältää ORF-alueet US2 - US5 (emäkset 193119 - 195607). On ehdotettu, että US2 ja US3 koodittavat membraaniglykoproteiineja (Chee et al., 1990). US3 on differentiaalisesti silmukoitu geeni, jota ekspressoidaan läpi koko viruksen replikaatiosyklin ja se koodittaa proteiinia, jolla on transkriptioaktivaatiotoiminta (Tenney ja Colberg-Poley, 1991; Colberg-Poley et al., 1992; Tenney et al., 1993; Weston, 1988). Tällä osa-alueella on läsnä myös useita pienempiä ORF-alueita (ORF-alueiden US3 ja US5 välissä), mutta niiden ekspressio-ominaisuuksia tai toimintoja ei ole julkaistu. Gretch ja Stinski (1990) julkaisivat, että tältä HCMV-genomin alueelta transkriptoidaan 1,0 kb pituinen aikainen mRNA-molekyyli, mutta sitä ei hienokartoitettu. Nyt on havaittu ensimmäistä kertaa, että US2-geenin ekspressio on se, joka riittää MHC luokan I -raskasketjuekspression vähentämiseen tässä lokuksessa (US2 - US5).

Osa-alue B, joka riittää myös MHC luokan I -raskasketjuekspression vähentämiseen, sisältää US10- ja US11-geenit (kuvio 9), emäkset 199083 - 200360. Kuitenkaan, perustuen tuloksiin käytettäessä HCMV-mutanttia RV670,

joka ekspressoi US10-geenituotetta villityypin tasoina, US10-geenin ekspressio ei ole riittävä raskasketjuekspression vähentämiseen (kuvio 5A). Geneettiset tulokset viittasivat, että tarvitaan US11-geenituotetta. Tässä on osoitettu, että US11-ekspressio riittää aiheuttamaan MHC luokan I -raskasketjuekspression vähenemisen stabiilisti transfektoiduissa infektoimattomissa soluissa silloin, kun muita MCNV-proteiineja ei ole läsnä (kuvio 15). RNA- ja proteiiniekspressio US11-alueelta alkaa aikaisin ja jatkuu läpi koko infektion (Jones ja Muzithras, 1991). US11-geeni koodittaa 32 kDa (gpUS11) kokoista glykoproteiinia, joka sisältää N-sidoksellisia sokerijäännöksiä, jotka ovat herkkiä endoglykosidaasi H -entsyymille. Immunofluoresenssikokeet osoittavat, että gpUS11-proteiini ei ole läsnä solun pinnalla, vaan se havaitaan HCMV-viruksella infektoituneiden solujen sytoplasmassa (kuvio 10). Näin ollen gpUS11-proteiini pysyy endoplasmisessa retikkulumissa tai Golgin laitteen etupuolella. HCMV gpUS11 -proteiinin ominaisuudet ovat samanlaisia kuin 25 kDa kokoisen glykoproteiinin (E3-19K), jota kooditetaan adenovirus tyypin 2 -viruksen E3-alueelta. Ad E3-19K -proteiini ei ole elintärkeä viruksen replikaatiolle. Sen on osoitettu sisältävän endoglykosidaasi H -herkät N-sidokselliset sokerijäännökset, olevan endoplasmisessa retikkulumissa ja sitovan MHC luokan I -raskasketjuja näin estäen niiden kuljetuksen solun pinnalle (Anderson et al., 1985; Burgert ja Kvist, 1985). Toisin kuin Ad E3-19K -proteiinilla, suoraa assosiaatiota gpUS11-proteiinin ja luokan I -raskasketjujen (se on, yhteisimmuunisaostumisella) välillä ei havaittu (tuloksia ei esitetty).

US2 - US11-geenialueen tunnistus siksi HCMV-genomin alueeksi, joka tarvitaan MHC luokan I -raskasketjuekspression vähentämiseksi, on merkittävä useista syistä. Kuten yllä mainittiin, ekspressio tästä genomin alueesta koko infektion ajan toimii häiriten tehokasta soluvälitteistä

immuunivastetta. MHC luokan I -molekyylien pintaekspressiota tarvitaan antigeenin ilmenemiseksi sytotoksisten T-lymfosyyttien (CTL) esiastepopulaatioiden aktivoimiseksi ja lisäämiseksi (Schwartz, 1985). Lisäksi niitä tarvitaan edelleen siihen, että aktivoituneet CTL-solut tunnistavat kohteen (Zinkernagel ja Doherty, 1980). MCMV-viruksen tapauksessa pääasiallista erittäin aikaista proteiinia vastaan olevat CTL-solut suojaavat tämän viruksen aiheuttamaa tappavaa infektiota vastaan (Jonjic et al., 1988). Kuitenkin, HCMV-viruksella infektoituneissa yksilöissä CTL-solujen frekvenssin analogista HCMV-viruksen erittäin aikaista proteiinia IE1 vastaan on julkaistu olevan erittäin harvinainen (Gilbert et al., 1993). Viimeaikaiset tutkimukset ovat osoittaneet, että IE-peptidit ilmenevät tehokkaammin interferoni-gamma-käsiteltyjen HCMV-infektoitujen solujen toimesta kuin käsittelemättömien solujen toimesta (Gilbert et al., 1993). Interferoni-μ-proteiini aiheuttaa MHC luokan I -proteiinien kohonneen pintaekspression. Näin ollen, luokan I -raskasketjujen ekspression kohottaminen HCMV-viruksella infektoituneissa soluissa voi olla tärkeä IE-spesifisten CTL-solujen tai muita tärkeitä HCMV-antigeeneja vastaan olevien CTL-solujen tehokkaaksi muodostumiseksi. HCMV-mutantilla, josta US2 -US11-geenialue on deletoitu, olisi tämä vaikutus, koska luokan I -raskasketjuekspressiota ei vähennetä, kun solut infektoituvat tällä mutantilla. Sen vuoksi tämän virusgenomialueen deleetio on tärkeää sellaisen elävän HCMV-rokotteen kehitykselle, joka indusoi tehokkaan anti-HCMV-immuunivasteen.

Sen ratkaiseminen, että US2- ja US11-geenituotteet riittävät luokan I -raskasketjuekspression vähentämiseen, on tärkeää monesta syystä perustuen siihen tosiasiaan, että luokan I -proteiinit välittävät sytotoksisten T-lymfosyyttien, jotka ovat primaarinäyttelijöitä solun immuunivasteessa, aktivoitumisen ja kohdesolutunnistuksen. US2 ja US11 voidaan sisällyttää geeneinä tai, ehkä, proteii-

neina kliinisiin hoitostrategioihin, kun solun MHC luokan I -proteiinien ekspressio on epätoivottavaa: geeniterapia-vektoreihin (esim. adenovirusvektoreihin) ja allograftin hyljinnän ehkäisemiseksi. US2- ja US11-alueita voidaan käyttää työkaluina muiden sellaisten soluproteiinien tunnistamiseksi, jotka voivat reagoida luokan I -raskasketjujen kanssa ja näin vaikuttaa luokan I -raskasketjuproteiinien stabiilisuuteen, prosessointiin ja kuljetukseen solun pinnalle. HCMV-rokotestrategiassa, jossa käytetään elävää virusta, US2- tai US11-alueen, tai molempien, poisto voi muodostaa viruksen, joka on parempi immunogeeni kuin virus, joka sisältää nämä geenit.

Useita vuosia sitten julkaistiin, että HCMV UL18 -ORF-alue kooditti proteiinia, joka muistutti MHC luokan I -raskasketjuja (Beck ja Barrell, 1988). Muodostettiin hypoteesi, että raskasketjuekspression väheneminen HCMV-viruksella infektoituneissa soluissa johtui UL18-geenituotteen kilpailusta ß2-mikroglobuliiniproteiinista, joka tehokkaasti esti luokan I -raskasketjujen ja ß2-mikroglobuliinin normaalin assosiaation (Browne et al., 1990). Tämä hypoteesi hylättiin oleellisesti, kun HCMV-mutantti, josta UL18-geeni oli deletoitu, säilytti kykynsä raskasketjuekspression vähentämiseen (Browne et al., 1992). Jäi mahdolliseksi, että UL18-geenituote oli ainoastaan yksi useasta HCMV-geenistä, jonka ekspressio rittää tätä fenotyyppiä varten. Kuitenkin esillä olevan keksinnön tulokset osoittavat, että ainoastaan geenit US2 - US11 -alueella riittävät luokan I -raskasketjuekspression vähentämiseen.

Kahden toisistaan riippumattoman mekanismin läsnäolo, jotka johtavat MHC luokan I -raskasketjuekspression vähenemiseen, korostaa tämän fenotyypin tärkeyttä onnistunutta infektiota ja isännässä säilymistä varten. Yksi mekanismi voi toimia varmistussysteeminä toiselle, mutta on myös mahdollista, että on olemassa solutyyppispesifisyys kummallekin systeemille. Samanlaiset olosuhteet ovat

herpes simplex -virussysteemissä. Äskettäin julkaistiin, että 88 aminohapon pituinen US12-geenituote (ICP47) riittää luokan I -raskasketjun eristymiseen endoplasmiseen retikkulumiin (York et al., 1994). Raskasketjujen ekspressio ei kuitenkaan vaikuteta herpes simplex -viruksella infektoituneissa hiiren soluissa, vaikka ICP47-proteiinia ekspressoidaan niissä soluissa ja hiiren raskasketjuekspressio on vähentynyt, kun ekspressoidaan HSV-viruksella infektoituneessa ihmisen fibroblastisysteemissä (York et al., 1994).

Voidaan valmistaa sellainen farmaseuttinen koostumus, joka sisältää esillä olevan keksinnön mukaisen HCMV-rekombinanttimutantin, jonka genomista on deletoitu se HCMV-genomin alue, joka kykenee vähentämään MHC luokan I -raskasketjuekspressiota infektoituneissa soluissa. HCMV-genomin deletoitu alue on suositeltavasti avoin lukuraami US2, US11 tai molemmat. Stabilointiainetta tai muuta sopivaa vehikkeliä voidaan käyttää farmaseuttisessa koostumuksessa.

Kuten aiemmin keskusteltiin, esillä olevan keksinnön mukaista HCMV-rekombinanttimutanttia, josta on deletoitu HCMV-genomin alue, joka kykenee vähentämään MHC luokan I -raskasketjuekspressiota, voidaan käyttää rokotteena sytomegalovirusinfektioiden ehkäisemiseksi. HCMV-genomin deletoitu alue on suositeltavasti avoin lukuraami US2, US11 tai molemmat. Rokote sisältää tehokkaan määrän HCMV-rekombinanttimutanttia farmaseuttisesti hyväksyttävässä vehikkelissä. Rokotteeseen voidaan vaihtoehtoisesti lisätä adjuvantti.

Menetelmä yksilön immunisoimiseksi sytomegalovirusta vastaan voidaan suorittaa antamalla yksilölle immunogeeninen määrä esillä olevan keksinnön mukaista HCMV-rekombinanttimutanttia, josta puuttuu geenisekvenssi, joka kykenee vähentämään MHC luokan I -proteiiniekspressiota.

Deletoitu geenisekvenssi on suositeltavasti alue, joka sisältää avoimen lukuraamin US2, US11 tai molemmat.

Menetelmä yksilön akuutille sytomegalovirukselle olevan herkkyyden ehkäisemiseksi tai vähentämiseksi voidaan suorittaa antamalla yksilölle immunogeeninen määrä esillä olevan keksinnön mukaista HCMV-rekombinanttimutanttia, josta puuttuu geenisekvenssi, joka kykenee vähentämään MHC luokan I -proteiinieksPressiota. Deletoitu geenisekvenssi on suositeltavasti alue, joka sisältää avoimen lukuraamin US2, US11 tai molemmat.

MHC luokan I -proteiinieksPression vähenemistä sytomegaloviruksella infektoituneessa solussa voidaan säädellä menetelmällä, joka sisältää vaiheet, joissa tunnistetaan geenisekvenssi, joka kykenee vähentämään pääasiallisen histokompatibiliteettikompleksin ekspressiota, ja deletoidaan tunnistettu geenisekvenssi sytomegaloviruksen genomista.

Kuten aiemmin on keskusteltu, MHC luokan I -raskasketjueksPression vähenemiseen osaaottava geenisekvenssi voidaan sisällyttää adenovirusvektoreihin tai samanlaisiin virusperusteisiin geeniterapiavektoreihin niin, että minimoidaan immuunivaste ja sallitaan vektorien käyttö geeniterapiassa. Yksi virusperusteinen geeniterapiavektori sisältää US2-geenisekvenssin avoimen lukuraamin. Toinen virusperusteinen geeniterapiavektori sisältää US11-geenisekvenssin avoimen lukuraamin. Toinen virusperusteinen geeniterapiavektori sisältää osa-alueiden A ja B geenisekvenssit (avoimet lukuraamit US2 - US5 ja US10 - US11, vastaavasti).

Esimerkki 1

Virus ja solut

HCMV-kanta AD169 saadaan kokoelmasta American Type Culture Collection ja sitä kasvatetaan alan asiantuntijoiden tuntemien standardimenetelmien mukaisesti. Ihmisen esinahan fibroblastisolut (HFF) eristettiin tässä labora-

toriossa ja niitä käytettiin nuorennusvaiheeseen 20 asti (Jones ja Muzithras, 1991). Niitä kasvatettiin Dulbecco's modified Eagle -alustassa (DMEM), joka sisälsi 10 % naudan sikiön seerumia ja 25 mM HEPES-puskuria.

DNA-sekvenssi

Esillä olevassa keksinnössä käytetään HCMV-kannan AD169 DNA-sekvenssin (Genbank-koodinumero X17403) numerointisysteemiä, joka on julkaisun Chee et al. (1990) mukainen.

Plasmidit

HCMV-mutanttien muodostamiseksi käytetyt plasmidit rakennettiin käyttäen aiemmin kuvattua menetelmää (Jones et al., 1991; Jones ja Muzithras, 1992). Yleisesti, ß-glukuronidaasireportterigeenin molemmin puolin on 1,5 kb pituinen alue HCMV-sekvenssejä, jotka ovat sen geenin (niiden geenien) vieressä, joka (jotka) deletoidaan viruksesta. Kussakin tapauksessa plasmidi-DNA linearisoidaan ennen transfektiota restriktioentsyymillä, joka katkaisee prokaryoottisen rungon. HCMV-kannan AD169 genomiset DNA-fragmentit ovat peräisin joko pHind-G-, pHind-X- tai pXba-P-plasmideista, jotka sisältävät HindIII-G (emäkset 176844 - 195837), -X- (emäkset 195837 - 200856) ja XbaI-P-DNA-fragmentit (emäkset 200391 - 206314), vastaavasti (Oram et al., 1982; Jones et al., 1991). Plasmidi pUS7/US3 sisälsi 1,7 kb pituisen PstI-PstI-HCMV-fragmentin [emäkset 196447 - 194741 pIBI30-vektorissa (International Biotechnologies, Inc.)], joka on peräisin pHind-G- ja pHind-X-plasmideista.

ORF-alueiden IRS1 - US9 ja US11 (mutta ei US10) korvaaminen ß-glukuronidaasilla ja plasmidivektorisekvenseillä (se on, RV670-mutantti), on kuvattu aiemmin (Jones ja Muzithras, 1992).

HCMV ORF-alueiden US11 - IRS1 korvaamiseksi ß-glukuronidaasilla (se on, RV7186-mutantti; kuvio 1B), rakennettiin plasmidi pBgdUS11/IRS1. Tämä plasmidi sisälsi pe-

räkkäin 1,8 kb pituisen PstI-XbaI-fragmentin (emäkset 202207 - 200391, joka sisältää US13-, US12- ja US11-promoottorisekvenssit plasmidista pXba-P), ß-glukuronidaasin, 288 emäksen pituisen SV40-fragmentin, joka sisältää aikaiset ja myöhäiset polyadenylaatiosignaalit [plasmidista pRcCMV (Invitrogen)] ja 1,7 kb pituisen NcoI-NcoI-fragmentin (emäkset 189763 - 188062, joka sisältää J1I - IRL1-sekvenssit plasmidista pHind-G).

HCMV ORF-alueiden US11 - US2 korvaamiseksi ß-glukuronidaasilla (se on, RV798-mutantti; kuvio 1C), rakennettiin plasmidi pBgdUS11/US2. Tämä plasmidi sisälsi peräkkäin 1,8 kb pituisen PstI-XbaI-fragmentin (emäkset 202207 - 200391, joka sisältää US13-, US12- ja US11-promoottorisekvenssit plasmidista pXba-P), ß-glukuronidaasin, 255 emäksen pituisen fragmentin, joka sisältää US10-geenin polyadenylaatiosignaalin (emäkset 199276 - 199021 plasmidista pHind-X) ja 1,3 kb pituisen NheI-ApaI-fragmentin (emäkset 193360 - 192033, joka sisältää sekvenssit C-pään US2-sekvenssistä IRS1-sekvenssiin plasmidista pHind-G).

HCMV ORF-alueiden US11 - US6 korvaamiseksi ß-glukuronidaasilla (se on, RV35-mutantti; kuvio 1D), rakennettiin plasmidi pBgdUS11/US6. Tämä plasmidi sisälsi peräkkäin 1,8 kb pituisen PstI-XbaI-fragmentin (emäkset 202207 - 200391, joka sisältää US13-, US12- ja US11-promoottorisekvenssit plasmidista pXba-P), ß-glukuronidaasin ja 1,5 kb pituisen HpaI-SstII-fragmentin (emäkset 195589 - 194062, joka sisältää sekvenssit C-pään US6-sekvenssistä US3-sekvenssiin plasmidista pHind-G).

HCMV ORF-alueiden US11 - US10 tai ORF-alueen US11 (yksittäin) korvaaminen ß-glukuronidaasilla (se on, RV67- ja RV699-mutantit, vastaavasti) on kuvattu aiemmin (Jones et al., 1991). Lisäksi HCMV ORF -alueiden US9 - US8, US7 (yksittäin) tai US6 (yksittäin) korvaaminen ß-glukuronidaasilla (se on, RV80-, RV725- ja RV69-mutantit, vastaavasti) on kuvattu aiemmin (Jones ja Muzithras, 1992).

HCMV ORF-alueiden US9 - IRS1 korvaamiseksi ß-glukuronidaasilla (se on, RV7181-mutantti; kuvio 1E), rakennettiin plasmidi pBgdUS9/IRS1. Tämä plasmidi sisälsi peräkkäin 1,1 kb pituisen SalI-ApaI-fragmentin (emäkset 200171 - 199021), 351 emäksen pituisen SV40-aikaisen promoottorin (plasmidista pRcCMV), ß-glukuronidaasin, 288 emäksen pituisen SV40-polyadenylaatiosignaalifragmentin ja 1,7 kb pituisen NcoI-NcoI-fragmentin (emäkset 189763 - 188062, joka sisältää J1I - IRL1 -sekvenssit plasmidista pHind-G).

HCMV ORF-alueiden US6 - IRS1 korvaamiseksi ß-glukuronidaasilla (se on, RV7177-mutantti; kuvio 1F), rakennettiin plasmidi pBgdUS6/IRS1. Tämä plasmidi sisälsi peräkkäin 1,7 kb pituisen NcoI-NcoI-fragmentin (emäkset 188062 - 189763, joka sisältää IRL1-, J1I- ja IRS1-promoottorisekvenssit plasmidista pHind-G), ß-glukuronidaasin, 255 emäksen pituisen fragmentin, joka sisältää US10-geenin polyadenylaatiosignaalin (emäkset 199276 - 199021 plasmidista pHind-X) ja 1,8 kb pituisen BsmI-SauI-fragmentin (emäkset 196222 - 198030, joka sisältää sekvenssit US7-alueesta C-pään US9 -sekvensseihin plasmidista pHind-X).

HCMV ORF-alueiden US3 ja US2 korvaamiseksi ß-glukuronidaasilla (se on, RV47-mutantti; kuvio 1G), rakennettiin plasmidi pBgdUS3/US2. Tämä plasmidi sisälsi peräkkäin 1,7 kb pituisen PstI-PstI-fragmentin (emäkset 196447 - 194741), 180 emäksen pituisen SmaI-HaeIII-fragmentin, joka sisältää HSV-1-viruksen gH-promoottorin (McKnight, 1980), ß-glukuronidaasin, 255 emäksen pituisen US10-geenin polyadenylaatiosignaalifragmentin ja 1,3 kb pituisen NheI-ApaI-fragmentin (emäkset 193360 - 192033, joka sisältää sekvenssit C-pään US2-sekvenssistä IRS1-sekvenssiin plasmidista pHind-G).

HCMV ORF-alueen US1 korvaamiseksi ß-glukuronidaasilla (se on, RV5122-mutantti; kuvio 1H), rakennettiin

plasmidi pBgdUS1. Tämä plasmidi sisälsi peräkkäin 1,8 kb pituisen AatII-SstI-fragmentin (emäkset 190884 - 192648, joka sisältää IRS1 ja US1 C-pään sekvenssit plasmidista pHind-G), 180 emäksen pituisen SmaI-HaeIII-fragmentin, joka sisältää HSV-1-viruksen gH-promoottorin (McKnight, 1980), ß-glukuronidaasin, 255 emäksen pituisen US10-geenin polyadenylaatiosignaalifragmentin ja 1,6 kb pituisen SphI-SphI-fragmentin (emäkset 192934 - 194544, joka sisältää US2- ja C-pään US3-sekvenssit plasmidista pHind-G).

HCMV ORF-alueen IRS1 korvaamiseksi ß-glukuronidaasilla (se on, RV46-mutantti; kuvio 1I), rakennettiin plasmidi pBgdIRS1. Tämä plasmidi sisälsi peräkkäin 1,7 kb pituisen NcoI-NcoI-fragmentin (emäkset 188062 - 189763, joka sisältää IRL1-, J1I- ja IRS1-promoottorisekvenssit plasmidista pHind-G), ß-glukuronidaasin, 255 emäksen pituisen fragmentin, joka sisältää US10-geenin polyadenylaatiosignaalin (emäkset 199276 - 199021 plasmidista pHind-X) ja 1,2 kb pituisen NarI-XhoI-fragmentin (emäkset 191830 - 193003, joka sisältää C-pään IRS1-sekvenssin ja US1-sekvenssin plasmidista pHind-G).

HCMV ORF-alueiden US11 - US2 deletoimiseksi ilman reportterigeenin insertiota (se on, RV799-mutantti, kuvio 1J), rakennettiin plasmidi pdUS11/US2. Tämä plasmidi sisälsi peräkkäin 1,8 kb pituisen PstI-XbaI-fragmentin (emäkset 202207 - 200391, joka sisältää US13-, US12- ja US11-promoottorisekvenssit plasmidista pXba-P), ß-glukuronidaasin, 65 emäksen pituisen NruI-ApaI-fragmentin, joka sisältää US10-geenin polyadenylaatiosignaalin (emäkset 199086 - 199021 plasmidista pHind-X) ja 1,3 kb pituisen NheI-ApaI-fragmentin (emäkset 193360 - 192033, joka sisältää sekvenssit C-pään US2-sekvenssistä IRS1-sekvenssiin plasmidista pHind-G).

HCMV ORF-alueiden US11 - US4 korvaamiseksi ß-glukuronidaasilla (se on, RV8146-mutantti, kuvio 2B), rakennettiin plasmidi pBgdeltaUS11/US4. Tämä plasmidi sisälsi

peräkkäin 1,8 kb pituisen PstI-XbaI-fragmentin (emäkset 202207 - 200391, joka sisältää US13-, US12- ja US11-promoottorisekvenssit plasmidista pXba-P), ß-glukuronidaasin, 180 emäksen pituisen SmaI-HaeIII-fragmentin, joka sisältää HSV-1-viruksen tymidiinikinaasigeenin polyadenylaatiosignaalin (McKnight, 1980) ja 1,662 kb pituisen EcoRV-SmaI-fragmentin (emäkset 195083 - 193421, joka sisältää US3- ja US2-sekvenssit plasmidista pHind-G)

HCMV ORF-alueiden US11 - US3 korvaamiseksi ß-glukuronidaasilla (se on, RV8173-mutantti, kuvio 2C), rakennettiin plasmidi pBgdeltaUS11/US3. Tämä plasmidi sisälsi peräkkäin 1,8 kb pituisen PstI-XbaI-fragmentin (emäkset 202207 - 200391, joka sisältää US13-, US12- ja US11-promoottorisekvenssit plasmidista pXba-P), ß-glukuronidaasin, 180 emäksen pituisen SmaI-HaeIII-fragmentin, joka sisältää HSV-1-viruksen tymidiinikinaasigeenin polyadenylaatiosignaalin (McKnight, 1980) ja 1,464 kb pituisen KpnI-SacI-fragmentin (emäkset 194112 - 192648, joka sisältää US2- ja US1-sekvenssit plasmidista pHind-G)

HCMV-rekombinanttimutantin eristys

HCMV-rekombinanttimutantin muodostus ja eristys suoritettiin, kuten on kuvattu aiemmin (Jones et al., 1991; Jones ja Muzithras, 1992). HFF-solut jaettiin niin, että ne olivat 70 - 80 % konfluentteja transfektiopäivänä. Solut trypsinisoitiin ja suspensoitiin tiheytenä 5,6 x 10^5 solua per ml alustaan, joka oli DMEM/10 % FCS/25 mM HEPES. DNA transfektoitiin käyttäen modifioitua kalsiumfosfaatti-yhteissaostusmenetelmää. 1,5 µg infektiivistä HCMV-DNA:ta ja 2,5 µg linearisoitua plasmidi-DNA:ta sekoitettiin kalsiumkloridiliuoksessa (300 µl, joka sisälsi 10 mM Tris-puskuria, pH 7,0/250 mM kalsiumkloridia) ja jäähdytettiin jäissä. Yhteissaostuksen aloittamiseksi DNA poistettiin jäistä ja lisättiin 300 µl 2 x HeBS-puskuria, pH 6,95 (huoneenlämpötilassa; 1 x HeBS oli 19,2 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,8 mM natriumfosfaatti, 0,1 % dekstroo-

si), tipoittain sekoittaen varovasti. 1,5 minuutin kuluttua saostuma laitettiin jäihin (niin, että estettiin lisäsaostumisen muodostuminen). Saostuma sekoitettiin 3 x 10^6 solun kanssa (suspensiossa) ja sijoitettiin 82 mm kudosviljelymaljalle. Kun oli pidetty kuusi tuntia 37 °C:ssa, alusta poistettiin ja soluille annettiin sokki 20 % DMSO:lla 1 x HeBS-puskurissa kahden minuutin ajan. Solut pestiin kaksi kertaa PBS:llä ja lisättiin kasvualustaa. Alusta vaihdettiin joka 4 - 7 vuorokausi. 14 vuorokauden kuluttua virusplakit olivat havaittavissa ja solujen päälle laitettiin 0,5 % agaroosi DMEM-alustassa, joka sisälsi 150 µg X-gluc-yhdistettä/ml (5-bromi-4-kloori-3-indoli-1-glukuronidi; Biosynth). Siniset plakit (se on, ß-glukuronidaasipositiiviset mutanttivirusplakit) poimittiin useita vuorokausia päällyskerroksen lisäyksen jälkeen. Rekombinanttivirukset plakkipuhdistettiin kolme kertaa. HCMV-mutantti RV799 oli ß-glukuronidaasinegatiivinen ja se eristettiin käyttäen yllä olevan menetelmän modifikaatiota. Tässä tapauksessa ß-glukuronidaasipositiivinen HCMV-mutantti RV134 oli emovirus (Jones et al., 1991). Näin ollen RV134-viruksen genomista DNA:ta käytettiin villityypin kannan AD169 DNA:n sijasta transfektioissa. Primaariset plakit, jotka ilmestyivät primaarisille transfektiomaljoille, poimittiin umpimähkäisesti ja ne maljattiin uudelleen HFF-soluille. Kymmenen vuorokauden jälkeen alusta poistettiin ja infektoituneiden solujen päälle laitettiin X-gluc-yhdistettä sisältävä agaroosi, kuten yllä on kuvattu. Tässä tapauksessa poimittiin valkoiset plakit (ß-glukuronidaasinegatiiviset mutanttivirusplakit) neljä vuorokautta myöhemmin ja plakkipuhdistettiin. Kunkin HCMV-mutantin oikea genominen organisaatio varmistettiin DNA blot -hybridisaatioanalyysillä, kuten on kuvattu aiemmin (Jones et al., 1991).

Vasta-aineet

HCMV US11 -proteiinien ja HCMV UL80 -proteiinien kanssa reaktiiviset kanin polyklonaaliset antiseerumit on kuvattu aiemmin (Jones et al., 1991; 1994). Hiiren monoklonaalinen vasta-aine W6/32, joka on spesifinen konformaatiosta riippuvalle ihmisen MHC luokan I -raskasketjuproteiinien epitoopille, ja monoklonaalinen vasta-aine Ber-T9, joka on spesifinen ihmisen transferriinireseptorille, hankittiin. Hiiren monoklonaalinen vasta-aine TP25.99 (D'Urso et al., 1991), joka on spesifinen konformaatiosta riippumattomalle ihmisen MHC luokan I -raskasketjuproteiinien epitoopille, hankittiin tohtori S. Ferrone'lta (Department of Microbiology, New York Medical College, Valhalla, NY). Hiiren monoklonaalinen vasta-aine 9221, joka on spesifinen HCMV IE1-proteiinille, hankittiin Dupont'lta.

Polyklonaalinen US2-antiseerumi saatiin eristämällä US2-glutationi S-transferaasi -fuusioproteiini (GST), jota käytettiin sen jälkeen immunogeeninä kaneissa. Spesifisesti, se osa HCMV US2 -geenistä, joka koodittaa aminohappoja 20 - 110, muodostettiin polymeraasiketjureaktiolla NcoI/EcoRI-fragmenttina ja se fuusioitiin lukuraamiin GST-proteiinin C-pään kanssa pGST(Nco)-vektoriin niin, että saatiin plasmidi pGST(Nco)-US2. Vektori pGST(Nco) modifioitiin glutationi S-transferaasi-fuusiovektorista pGEX-2T (Pharmacia-artikkelinumero 27-4801-01) digestoimalla SmaI-entsyymillä ja lisäämällä NcoI-linkkerit niin, että avoin lukuraami säilyi. Plasmidi pGST(Nco)-US2 vietiin sisään E. coli -kantaan DH5 ja fuusioproteiinin synteesi indusoitiin IPTG-yhdisteellä. GST-US2-fuusioproteiini eristettiin sonikoiduista E. coli -soluista sitomalla se glutationi Sepharose 4B -resiiniin (Pharmacia) ja eluoimalla siitä, kuten valmistaja on kuvannut. 100 µg määriä GST-US2-fuusioproteiinia käytettiin immunogeenina naaraspuolisissa

valkoisissa New Zealand -kaneissa niin, että muodostettiin polyklonaalinen US2-antiseerumi.

Infektoitujen solujen proteiinien radioaktiivinen leimaus ja immuunisaostus

Radioaktiivinen pulssi - kylmäleimaus -menetelmä suoritettiin standardimenetelmän mukaisesti (Sambrook et al., 1989). HCMV-infektoidut HFF-solut (infektiomonikerta oli viisi) pulssileimattiin 200 μCi:lla [^{35}S]metioniinia ja [^{35}S]kysteiiniä (NEN-DuPont) per ml metioniini/kysteiini-vapaassa Dulbecco's modified Eagle -alustassa (DMEM) osoitetun aikajakson ajan infektion jälkeen. Radioaktiivinen alusta poistettiin, solut pestiin kahdesti täydellisellä DMEM-alustalla ja kylmäleimaukset suoritettiin osoitettujen ajanjaksojen ajan täydellisessä DMEM-alustassa. Proteiinit uutettiin käyttäen kolmoisdetergenttilyysipuskuria (Sambrook et al., 1989). Kirkastetut proteiiniuutokset (supernatantit sen jälkeen, kun oli sentrifugoitu 5 minuuttia voimalla 15 000 x g ja 4 °C:ssa) varattiin immuunisaostusta varten, joka suoritettiin standardimenetelmällä (Sambrook et al., 1989). Vasta-aineisiin sitoutuneet proteiinit pelletoitiin käyttäen proteiini A - Sepharose -resiiniä (Pharmacia). Immuunisaostuksia varten ihmisen transferriinireseptori, kanin anti-hiiri IgG (Pierce) lisättiin ennen proteiini A - Sepharose -resiiniä. Pestyt immuunisaostukset keitettiin 2-merkaptoetanolin läsnäollessa ja ne ajettiin elektroforeesissa denaturoivissa polyakryyliamidigeeleissä. Geelit fiksattiin ja niitä huuhdeltiin 1 M natriumsalisylaattifluoriliuoksessa (Sambrook et al., 1989) ennen kuivausta ja autoradiografiaa.

Immunofluoresenssi

Immunofluoresenssikokeet suoritettiin standardimenetelmän mukaisesti (Harlow, 1989). Kaikki menetelmät tehtiin 60 mm kudosviljelymaljoilla. Lyhyesti, infektoituneet tai infektoitumattomat HFF-solut fiksattiin 4 % paraformaldehydillä ja ne tehtiin läpäiseviksi 0,2 % Triton X-100-

detergentillä (kun on osoitettu). Kun oli lisätty 3 % naudan seerumialbumiinia fosfaatilla puskuroidussa suolaliuoksessa, soluja pidettiin yli yön 4 °C:ssa. Soluja käsiteltiin peräkkäin seuraavilla antiseerumeilla, kunkin kanssa 30 minuuttia huoneenlämpötilassa: 10 % HCMV-negatiivinen ihmisen seerumi (kaikkien Fc-reseptorien blokeeraamiseksi); osoitettu primaarinen vasta-aine; ja FITC-konjugoitu sopiva anti-hiiri tai anti-kani IgG-proteiini.

Esimerkki 2

Luokan I -proteiinieksPression väheneminen HCMV-viruksen infektoimissa ihmisen fibroblasteissa

MHC luokan I -raskasketjuekspression vähenemisen ajoitus ja luonne varmistettiin ihmisen esinahan fibroblastisoluviljelysysteemissä (HFF). Virtaussytometrilla mitattuna, jossa käytettiin konformaatiosta riippuvaista monoklonaalista luokan I vasta-ainetta W6/32, villityypin HCMV-kannalla AD169 infektoituneiden HFF-solujen luokan I -raskasketjuekspressio solupinnoilleen aleni merkittävästi myöhään infektion jälkeen (se on, 72 tuntia) (kuvio 3). Western analyyseissä, joissa käytettiin konformaatiosta riippumatonta luokan I monoklonaalista vasta-ainetta (TP25.99) osoitettiin, että luokan I -proteiinin steady state -taso aleni myös myöhään infektion jälkeen (kuvio 4A). Koska viruksen peptidit ilmennetään solun pinnalle luokan I -komplekseissa, jotka koostuvat infektion jälkeen, niiden luokan I -proteiinien tilanne, jotka syntetisoitiin eri aikoina infektion jälkeen, arvioitiin metabolisesti radioaktiivisiksi leimattujen proteiinien immuunisaostuksella. Kuten kuviossa 4B on osoitettu, luokan I -raskasketjuekspression väheneminen havaittiin sekä silloin, kun läsnä oli viruksen DNA-synteesin inhibiittoria, fosfonoformaattia, että kun sitä ei ollut. Tämä osoitti, että viruksen erittäin aikaiset tai aikaiset geenitoiminnat riittävät raskasketjuekspression vähentämiseen. Lisäksi osoitettiin, että raskasketjuekspression väheneminen

havaittiin hyvin aikaisessa vaiheessa infektion jälkeen: 3 tunnissa (kuvio 4C). Koska tämä vaikutus havaittiin käyttäen konformaatiosta riippumatonta vasta-ainetta, alenemi-nen heijastaa juuri syntetisoitujen raskasketjujen koko-naistasoja.

HCMV-mutanttien seulonta MHC luokan I -proteiini-ekspression vähenemisen häviämisen suhteen

Useat aiemmin rakennetut HCMV-deleetiomutantit, jotka edustivat 18 ei-elintärkeää ORF-aluetta (UL33, UL81, IRS1, US1 - US13, US27 - US28 ja TRS1), seulottiin raskas-ketjuekspression suhteen virtaussytometrialla ja immuuni-saostusanalyyseillä. Ainoastaan RV670-mutantissa, joka on mutantti, josta on deletoitu 9 kb pituinen alue HCMV-geno-min S-komponentista (Jones ja Muzithras, 1992), ei säily-nyt villityypin vähentävä fenotyyppi (kuvio 5A). Tästä mutantista oli deletoitunut ainakin 11 ORF-aluetta, IRS1 - US11 (paitsi US10), joka sisältää US6-geeniperheen (US6 - US11), jotka mahdollisesti koodittavat glykoproteiineja (Chee et al., 1990). Tämän havainnon varmistamiseksi kaksi toisistaan riippumattomasti muodostettua mutanttia, joissa oli sama deleetio kuin RV670-mutantissa, ja uusi mutantti RV7186, josta oli deletoitu koko IRS1 - US11 -alue (kuvio 1), testattiin lisää. Kukin oli fenotyyppisesti identtinen RV670-mutantin kanssa ja ekspressoivat stabiilisti luokan I -raskasketjuja. Aiemmin rakensimme HCMV-mutantit, joista oli deletoitu US6-perheen ORF-alueita joko yksittäin tai ryhmissä (Jones ja Muzithras, 1992), ja samanlaiset delee-tiomutantit viereiselle IRS1 - US3-alueelle. Immuunisaos-tuksella käyttäen konformaatiosta riippumatonta vasta-ai-netta, kaikkien näiden mutanttien osoitettiin säilyttävän kyvyn vähentää luokan I -raskasketjuekspressiota (kuvio 5A) myöhään infektion jälkeen HFF-soluissa. Verrokkikokeet osoittivat, että radioaktiivisuusleimaus oli yhtäläinen eri infektoitujen soluviljelmien välillä (kuvio 5B) ja että infektio jatkui myöhäisiin vaiheisiin yhtäläisesti,

joka määriteltiin pp65- (kuvio 5B) ja UL80-proteiinin (kuvio 5C) ekspressiolla. Nämä tulokset osoittavat: (i) että useampi kuin yksi virusgeeni riittää luokan I -raskasketjuekspression vähentämiseen; tai (ii) että geeni (geenit) US3- ja US6-alueiden välillä, joka on deletoitu RV670- ja RV7186-mutantista, mutta ei muista mutanteista, tarvitaan tätä fenotyyppiä varten.

MHC luokan I -ekspression vähentämiseen tarvittavan 7 kb pituisen HCMV-genomin alueen tunnistus

Sen alueen lisäpaikantamiseksi, joka sisältää geenin (geenit), joka (jotka) ottaa (ottavat) osaa MHC luokan I -raskasketjuekspression vähentämiseen, muodostettiin lisää HCMV-korvausmutantteja, jotka sisälsivät deleetiot useissa geeneissä IRS1 - US11 -geenialueella (kuvio 1). Yhdestä näistä mutanteista, RV798, oli deletoitu geenit alueelta US2 - US11. RV798-mutantilla infektoituneissa HFF-soluissa, jotka analysoitiin myöhään infektion jälkeen, ei MHC luokan I -raskasketjuekspressiota vähennetty, kuten sitä vähennettiin villityypin kannalla AD169 infektoituneissa soluissa (kuvio 5A); todellisuudessa havaitaan pieni stimulaatio. Useat toisistaan riippumattomasti saadut deleetiomutantit, jotka olivat identtisiä RV798-mutantille, tutkittiin samalla tavalla; kaikista puuttui kyky vähentää luokan I -raskasketjuekspressiota. Sen edelleen varmistamiseksi, että 7 kb pituinen HCMV US2 - US11-alue sisälsi geenin (geenit), jota (joita) tarvitaan raskasketjuekspression vähentämiseen, rakennettiin mutantti RV799, jossa oli samanlainen US2 - US11 -deleetio kuin mutantissa RV798, mutta joka muodostettiin eri strategialla. RV798 saatiin villityypin kannasta AD169 insertoimalla ß-glukuronidaasimerkkigeeni US2 - US11 -alueen tilalle. Tälle päinvastaisesti RV799-mutantin emo oli RV134-mutantti, joka oli ß-glukuronidaasipositiivinen, koska siinä oli ß-glukuronidaasiekspressiokasetti insertoituna intergeeniselle US9 -US10 -alueelle (Jones et al., 1991). RV799-mu-

tantin muodostamiseksi suunniteltiin plasmidi, joka rekombinoituessaan RV134-genomin kanssa deletoisi samalla US2 - US11-alueen ja ß-glukuronidaasiekspressiokasetin (kuvio 1J). Oikea RV799 HCMV -mutantti eristettiin valkoisena plakkina ß-glukuronidaasisubstraatin läsnäollessa, koska se oli ß-glukuronidaasinegatiivinen. RV799-mutantti, mutta ei RV134-emokanta, oli fenotyyppisesti identtinen RV798-mutantille (kuvio 6). Näin ollen, koska RV798- ja RV799-mutantit muodostettiin eri strategioilla käyttäen emokantoja, joissa oli säilynyt kyky vähentää MHC luokan I -raskasketjuekspressiota, tämä varmistaa, että geeni (geenit), joka (jotka) tarvitaan tätä fenotyyppiä varten, sijaitsee (sijaitsevat) 7 kb pituisella US2 -US11-alueella (emäkset 193119 - 200360).

Sen määrittämiseksi, tapahtuiko oikea luokan I -raskasketjujen pintaekspressio myöhään infektion jälkeen mutantissa RV798 tai RV799, suoritettiin immunofluoresenssitestit. Käyttäen joko konformaatiosta riippuvaista (W6/32) tai konformaatiosta riippumatonta (TP25.99) monoklonaalista vasta-ainetta, MHC luokan I -raskasketjujen pintaekspressio tunnistettiin infektoimattomissa ja RV798-ja RV799-mutanteilla infektoiduissa HFF-soluissa, mutta ei villityypin kannalla AD169 infektoiduissa HFF-soluissa. Luokan I -raskasketjujen oikea kypsyminen infektoimattomissa soluissa antoi endoglykosidaasi H -resistenttejä molekyylejä. Tälle päinvastaisesti AD169-viruksella infektoituneissa soluissa syntetisoitujen luokan I -raskasketjujen julkaistiin olevan kokonaan endoglykosidaasi H -herkkiä (Beersma et al., 1993). Kuten kuviossa 7 on osoitettu, RV798-mutantilla infektoituneissa HFF-soluissa joko aikaisin tai myöhään infektion jälkeen syntetisoituneet luokan I -raskasketjut muutettiin kypsäksi endoglykosidaasi H -resistentiksi muodoksi samalla nopeudella kuin ne, jotka syntetisoitiin infektoimattomissa soluissa. Yhteenvedettynä nämä tulokset osoittavat, että MHC luokan I

-proteiinien synteesi, prosessointi ja pintaekspressio ei ole häiriintynyt soluissa, jotka on infektoitu näillä HCMV-mutanteilla. Lisäksi nämä tulokset osoittavat, että 7 kb pituinen alue, joka sisältää US2 - US11-geenit, sisältää yhden tai useamman geenin, joka tarvitaan raskasketjuekspression vähentämiseen HCMV-viruksen toimesta.

Kaksi osa-aluetta US2 - US11-geenialueella sisältävät geenit, jotka ottavat osaa luokan I -raskasketjuekspression vähentämiseen

RV35-mutantista deletoitu HCMV-genomin alue oli US6 - US11, ja RV798-mutantista US2 - US11 (kuvio 1). RV35-mutantilla infektoituneissa HFF-soluissa MHC luokan I -raskasketjuekspressio vähentyi, mutta RV798-mutantilla infektoituneissa soluissa ei (kuvio 5A). Nämä tulokset osoittavat, että yksi tai useampi geeni, joka ottaa osaa raskasketjuekspression vähentämiseen, sijoittuu 2 kb pituiselle osa-alueelle ORF-alueella US2 - US5 (osa-alue A; emäkset 193119 - 195607). Sen määrittämiseksi, tarvitaanko tätä 2 kb pituista osa-aluetta luokan I -raskasketjuekspression vähentämiseen, tutkittiin HCMV-korvausmutantteja RV7181 ja RV7177. Näistä mutanteista on deletoitu HCMV-viruksen ORF-alueet IRS1 - US9 ja IRS1 - US6, vastaavasti (kuvio 1); näin ollen osa-alue A on poissa molemmista mutanteista. Kokeet infektoituneilla HFF-soluilla myöhään infektion jälkeen osoittavat, että molemmissa mutanteissa säilyi kyky tehokkaasti vähentää luokan I -raskasketjuekspressiota (kuvio 8). Sen vuoksi, kun ovat läsnä HCMV-genomissa, geeni (geenit) osa-alueella A riittää (riittävät) vähentämään MHC-ekspressiota (esim. mutantti RV35), vaikka niiden läsnäoloa ei tarvita fenotyyppiä varten. Lisäksi kumulatiiviset tulokset (yhteenveto kuviossa 9) osoittavat, että tunnistetulla 7 kb pituisella US2 - US11 -alueella (se on alue, joka on deletoitu mutantista RV798) ei ole yhtään HCMV-geeniä, joita ehdottomasti tarvitaan tehokasta raskasketjuekspression vähentämistä varten infek-

toituneissa HFF-soluissa, joka antaa ehdottaa, että geeni (geenit) muulta US2 - US11-geenialueelta riittää (riittävät) myös fenotyyppiä varten myöhään infektion jälkeen.

Todiste, joka osoittaa, että US11-geenituote ottaa osaa MHC luokan I -raskasketjuekspression vähentämiseen

Mutantilla RV7181, josta on deletoitu IRS1 - US9-alue (kuvio 1), infektoituneissa HFF-soluissa MHC luokan I -raskasketjuekspressio vähentyi toisin kuin RV798-mutantilla infektoituneissa HFF-soluissa (kuvio 8A). Tämä tulos antaa ehdottaa, että toinen osa-alue (osa-alue B), joka sisältää US10- ja US11-geenit (emäkset 199083 - 200360), ottaa osaa raskasketjuekspression vähentämiseen. US10-geenin ekspressio HCMV-genomiympäristöstä ei kuitenkaan riitä raskasketjuekspression vähentämiseen. HCMV-mutantti RV670 ekspressoi US10-geeniä steady state -tasoilla, jotka olivat samanlaisia kuin villityypin tasot, ja siitä oli deletoitu kaikki muut ORF-alueet 7 kb pituiselta US2 - US11 -geenialueelta, mutta se ei aiheuttanut MHC luokan I -raskasketjuekspression vähenemistä infektoituneissa HFF-soluissa (kuvio 5A). Näin ollen US11 on geeni osa-alueella B, johon nämä geneettiset tulokset viittaavat.

US11-geeni koodittaa 32 kDa glykoproteiinia (gpUS-11), joka sisältää N-sidoksellisia, mutta ei O-sidoksellisia, hiilihydraatteja, jotka ovat täysin herkkiä endoglykosidaasi H -entsyymille, joka osoittaa, että ne ovat mannoosirikkaassa muodossa. Proteiini gpUS11 oli havaittavissa läpi koko infektion alkaen hyvin aikaisessa vaiheessa (se on, 3 tuntia) infektion jälkeen ja jatkuen infektion myöhäisiin vaiheisiin. Proteiinin gpUS11 tasot infektoituneessa solussa ovat kuitenkin runsaimpia noin kahdeksan tuntia infektion jälkeen. Sen sijainnin määrittämiseksi infektoituneessa solussa, käytettiin kanin polyklonaalista antiseerumia (Jones ja Muzithras, 1991) immunofluoresenssitesteissä villityypin kannalla AD169 infektoituneilla soluilla. Infektoimattomia ja RV699-mutantilla

infektoituneita HFF-soluja käytettiin negatiivisina verrokkeina. RV699 on HCMV-mutantti, joka on isogeeninen AD169-kannan kanssa lukuunottamatta US11-ORF-alueen deleetiota (Jones et al., 1991). Kannalla AD169 infektoiduissa HFF-soluissa, jotka fiksattiin ja tehtiin läpäiseviksi kahdeksan tuntia infektion jälkeen, havaittiin sytoplasminen fluoresenssi, joka haittasi tuman määrittämistä, mutta sitä ei havaittu kummassakaan negatiivisessa verrokkisolussa (kuviot 10A ja 10C, vastaavasti). Yleisesti, spesifinen fluoresenssi oli voimakkaampi perinukleaarisella alueella. Mitään spesifistä fluoresenssia ei havaittu soluissa, joita ei oltu tehty läpäiseviksi (kuviot 10B ja 10D). Fluoresenssi- ja endoglykosidaasi H -herkkyyskokeiden tulokset osoittavat, että gpUS11 ei ole solun pinta-glykoproteiini. Transloidun DNA-sekvenssin perusteella proteiinin gpUS11 ennustetaan sisältävän hydrofobiset domeenit lähellä sen N- ja C-päitä (Weston ja Barrell, 1986), jotka ovat mahdollisia signaalisekvenssejä ja membraanin läpi meneviä domeeneja, vastaavasti. Näin ollen, gpUS11 assosioituu sytoplasman sisällä olevien membraanien, ehkä endoplasmisen retikkulumin tai Golgin laitteen etupuolisten membraanien, kanssa.

Todiste, joka osoittaa, että US2-geenituote ottaa osaa MHC luokan I -raskasketjuekspression vähentämiseen

Mutantilla RV35 infektoituneissa HFF-soluissa MHC luokan I -raskasketjuekspressio vähentyi, mutta ei RV798-mutantilla infektoituneissa soluissa (kuviot 11 ja 12). Sen HCMV-geenin määrittämiseksi osa-alueella A (se on, US2 - US5), joka riittää MHC luokan I -raskasketjuekspression vähentämiseen, rakennettiin useita HCMV-deleetiomutantteja lisää ja ne analysoitiin. Nämä uudet mutantit sisälsivät RV8146- ja RV8173-mutantit, joista deletoitiin geenialueet US4 - US11 ja US3 - US11, vastaavasti (kuvio 2). Uudet mutantit rakennettiin käyttäen aiemmin kuvattua homologisen rekombinaation menetelmää. Näillä viruksilla

infektoituneiden solujen luokan I -raskasketjuekspressio testattiin metabolisella radioaktiivisuusleimaus - immuunisaostuskokeilla. Toisin kuin RV798-mutantilla infektoituneissa soluissa, MHC luokan I -raskasketjuekspressio väheni soluissa, jotka infektoitiin RV8146- ja RV8173-mutantilla (kuvio 11). Näistä kokeista saadut kumulatiiviset tulokset osoittivat, että alueella US3 - US5 olevia geenejä ei tarvita luokan I -raskasketjuekspression vähentämiseen. Koska genotyyppiero mutanttien RV798 ja RV8173 välillä on US2-alueen läsnäolo jälkimmäisessä, US2-geeni paljastui näissä geneettisissä kokeissa.

RNA blot -analyysit osoittivat, että US2-geeniä transkriptoidaan lähes koko HCMV-viruksen replikaatiosyklin ajan hyvin aikaisista vaiheista (esim. 3 tuntia) myöhäisiin vaiheisiin (esim. 72 tuntia) infektion jälkeen (kuviot 13A ja 13B). US2-proteiinin (pUS2) ekspression analysoimiseksi suoraan tehtiin bakteerissa GST-US2-fuusioproteiini ja sitä käytettiin immunogeenina kaneissa sellaisen polyklonaalisen antiseerumin muodostamiseksi, joka reagoi pUS2-proteiinin kanssa. Tämä antiseerumi reagoi noin 24 kDa kokoisen proteiinin kanssa, joka ekspressoitui replikaatiosyklin ajan soluissa, jotka oli infektoitu HCMv-villityypin kannalla AD169 (kuvio 13C). pUS2-proteiinin ilmeinen massa näissä kokeissa vastasi hyvin tietokoneella laskettua US2-proteiinin massaa 23,1 kDa, joka oli peräisin transloidusta US2 DNA -sekvenssistä (Chee et al., 1990). Yllä kuvattujen geneettisten kokeiden tulokset ennustivat, että pUS2-proteiinia ekspressoidaan soluissa, jotka on infektoitu deleetiomutanteilla RV8146 ja RV8173, mutta ei soluissa, jotka on infektoitu RV798-mutantilla. Infektoituneiden solujen proteiinien Western blot -analyysit varmistivat tämän ennusteen (kuvio 13D).

MHC luokan I -raskasketjuekspression väheneminen lyhyen aikaa infektion jälkeen HCMV-mutanttien toimesta

MHC luokan I -ekspression väheneminen villityypin kannalla AD169 infektoituneissa soluissa on osoitettu alkavan hyvin aikaisin infektion jälkeen (kuvio 4C). Sen määrittämiseksi, puuttuuko jostain mutantista kyky tähän aikaiseen vähentämiseen, suoritettiin immuunisaostuskokeet käyttäen uutoksia infektoituneista HFF-soluista, jotka oli leimattu radioaktiiviksi 6 - 10 tuntia infektion jälkeen. Luokan I -raskasketjujen tasot alenivat tämän aikaisen periodin aikana infektion jälkeen HFF-soluissa kaikilla mutanteilla, paitsi RV798-mutantilla, josta on deletoitu koko 7 kb pituinen US2 - US11-alue (kuvio 14A). Verrokkikokeet osoittivat, että eri mutanteilla infektoidut solut olivat yhtäläisesti infektoituneet ja leimautuneet radioaktiiviksi (kuviot 14B ja D). Toisen solun glykoproteiinin, transferriinireseptorin, ekspressioon eivät eri mutantit vaikuttaneet eri tavalla (kuvio 14C). Näin ollen geenit, joita tarvitaan raskasketjuekspression vähentämiseen aikaisin infektion jälkeen, ovat samoja kuin ne, joita tarvitaan sen vähentämiseen myöhään infektion jälkeen. Lisäksi, geenin (geenien) ekspressio jommaltakummalta osa-alueelta, joiden on tunnistettu ottavan osaa raskasketjuekspression vähentämiseen myöhään infektion jälkeen, riittää sen vähentämiseen hyvin aikaisin infektion jälkeen.

Esimerkki 3

HCMV-rekombinanttirokotteen (RV798) valmistus

HCMV-rokotteet valmistettiin käyttäen aiemmin kuvattua menetelmää (Elek ja Stern, 1974). HCMV-mutanttia RV798 kasvatettiin ihmisen diploideissa MRC-5-keuhkofibroblasteissa [CCL171 (American Type Culture Collection)] tai ihmisen esinahan fibroblasteissa [MRHF (BioWhittaker)]. Solut infektoitiin infektiomonikerta-arvolla yksi Dulbecco's modified Eagle -alustassa (DMEM), joka sisälsi 5 % naudan seerumia ja 5 % naudan sikiön seerumia. 24 tun-

nin kuluttua alusta poistettiin ja solut pestiin kolme kertaa joko tasapainotetulla Hank's-suolaliuoksella tai fosfaattipuskuroidulla Dulbecco's-suolaliuoksella. Lisättiin tuoretta DMEM-alustaa ilman seerumia; infektoituja soluja inkuboitiin neljä vuorokautta viruksen myöhäisen sytopaattisen vaikutuksen ilmestymisen jälkeen (tavallisesti seitsemän vuorokautta infektion jälkeen). Esikirkastussentrifugaatiovaiheen (6 000 x g 20 minuuttia 18 °C:ssa) jälkeen soluvapaa virus pelletoitiin sentrifugoimalla voimalla 15 500 x g yhden tunnin ajan 18 °C:ssa. Pelletoitu virus suspensoitiin uudelleen fosfaatilla puskuroitiin Dulbecco's-suolaliuokseen, joka sisälsi 25 % sorbitolia, ja säilytettiin pieninä erinä -70 °C:ssa. RV798-rokotevarastoliuoksen tiitteri määritettiin käyttäen standardimenetelmiä ihmisen esinahan fibroblasteilla (Wentwork ja French, 1970). Rokote annetaan ihonalaisena ymppinä, jossa on noin 10^3 - 10^7 plakkia muodostavaa yksikköä, hartialihaksen alueelle olkavarteen, kuten on kuvattu aiemmin (Elek ja Stern, 1974; Gehrz et al., 1980; Starr et al., 1981).

Esimerkki 4

gpUS11-proteiini riittää MHC luokan I -raskasketjuekspression vähentämiseen

Esimerkin 2 deleetioviruksilla infektoitujen solujen geneettiset tulokset osoittivat, että US11 on se geeni osa-alueella B (se on, US10 - US11) HCMV-viruksessa, joka ottaa osaa MHC luokan I -raskasketjuekspression vähentämiseen. Sen määrittämiseksi, kykeneekö US11-geenituote, kaikkien muiden virusgeenituotteiden poissaollessa aiheuttamaan raskasketjuekspression vähentämisen, US11-geenin koodittava alue [emäkset 200360 - 199716 (Chee et al., 1990)] ja jonkin verran ei-koodittavia viereisiä sekvenssejä, jotka sisälsivät emäkset 200391 - 199683, kloonattiin eukaryoottiseen ekspressioplasmidiin HCMV-viruksen konstitutiivisen pääasiallisen erittäin aikaisen promoot-

tori-tehostin-alueen transkriptiosäätelyn alaisuuteen. Ihmisen U373-MG-astrosytoomasolut [HTB 17 (American Type Culture Collection)] transfektoitiin tällä plasmidilla (Sambrook et al., 1989) ja stabiilisti transformoituneet solut selektoitiin niin, että läsnä oli 0,375 µg puromysiiniä/ml, koska plasmidi koodittaa myös prokaryoottista puromysiiniresistenssigeeniä. Kloonit poimittiin ja ne laajennettiin solulinjoiksi. Ne, jotka ekspressoivat gpUS11-proteiinia, tunnistettiin Western blot -analyysillä; eri solulinjat ekspressoivat eri määriä US11-proteiinia. MHC luokan I -raskasketjuekspressio näissä solulinjoissa analysoitiin samalla tavalla. Kuten kuviossa 15 on esitetty, US11-geenin ekspressio korreloi käänteisesti luokan I -raskasketjuekspression suhteen. Nämä tulokset todistivat, että HCMV US11 -geenin ekspressio riittää MHC luokan I -raskasketjuekspression vähentämiseen silloin, kun läsnä ei ole muita virusgeenituotteita.

Esimerkki 5

pUS2-proteiini riittää MHC luokan I- raskasketjuekspression vähentämiseen

Esimerkin 2 deleetioviruksilla infektoitujen solujen geneettiset tulokset osoittivat, että US2 on se geeni osa-alueella A (se on, US2 - US5) HCMV-viruksessa, joka ottaa osaa MHC luokan I -raskasketjuekspression vähentämiseen. Tämän havainnon varmistamiseksi muodostettiin stabiilisti transfektoidut solut, jotka ekspressoivat konstitutiivisesti pUS2-proteiinia. Tässä tapauksessa HCMV US2 -geenin koodittava alue (emäkset 193715 - 193119) ja jonkin verran ei-koodittavia viereisiä sekvenssejä, jotka sisälsivät emäkset 193779 - 193003, kloonattiin ekspressiovektoriplasmidiin, jonka nimi oli pIEp-puro niin, että saatiin plasmidi pIEspUS2-puro. Tässä plasmidissa US2-alue oli HCMV-viruksen konstitutiivisen pääasiallisen erittäin aikaisen promoottori-tehostin-alueen transkriptiosäätelyn alaisuudessa. Tämä plasmidi sisälsi myös puromysiiniresis-

tenssigeenin ekspressiokasetin. Kun plasmidi oli transfektoitu U373-MG-astrosytoomasoluihin, stabiilisti transfektoituneet solulinjat selektoitiin ja kloonattiin niin, että läsnä oli puromysiiniyhdistettä (0,375 µg/ml). Negatiiviseksi verrokiksi transfektoitiin samanlainen plasmidi (pIEspBgluc-puro), joka sisältää prokaryoottisen ß-glukuronidaasigeenin US2-geenin sijasta, ja solulinjat selektoitiin ja kloonattiin. Näiden solulinjojen steady state -proteiiniekspressio analysoitiin Western blot -analyysillä.

Samalla tavalla kuin esimerkin 4 US11-proteiinia ekspressoivilla solulinjoilla, US2-proteiinin ekspression havaittiin korreloivan käänteisesti solun MHC luokan I -raskasketjujen ekspressioon. Spesifisesti, U373-MG-emosolulinja ja solulinjat 55 - 212 ja 55 - 215, jotka ovat peräisin transfektiosta negatiivisella verrokkiplasmidilla, eivät ekspressoineet US2-proteiinia ja niissä oli korkeat tasot luokan I -raskasketjuja (kuvio 16, kaistat 1 - 3). Solulinjat 55 - 303, 55 - 304 ja 55 - 310 transfektoitiin plasmidilla pIEspUS2-puro ja ne ekspressoivat US2-proteiinia, mutta niissä oli suhteellisen matalat tasot luokan I -raskasketjuja (kuvio 16, kaistat 5 - 7). Toinen solulinja, joka oli peräisin transfektiosta plasmidilla pIEspUS2-puro, 55-302, ei ekspressoinut US2-proteiinia (johtuen ehkä US2-geenin hajoamisesta tämän solulinjan muodostuksen aikana), mutta ekspressoi korkeita luokan I -raskasketjujen tasoja (kuvio 16, kaista 4). Kumulatiiviset tulokset osoittivat, että US2-proteiinin ekspressio aiheuttaa MHC luokan I -raskasketjuekspression vähenemisen.

HCMV-infektoituneiden solujen tulokset osoittivat, että MHC luokan I -raskasketjuekspressio vähenee transkription jälkeisellä mekanismilla, joka johtaa näiden proteiinien kohonneeseen turnover-nopeuteen (se on, lyhyempään puoli-ikään) (Beersma et al., 1994; Yamashita et al.,

1994). Mutantilla RV35 (deletoitu US6 - US11 ja sisältää US2 - US5 -lokukset) infektoiduissa soluissa luokan I -raskasketjujen puoli-ikä on noin 0,5 tuntia, kun taas infektoimattomissa soluissa ja RV798-mutantilla infektoiduissa soluissa puoli-ikä on > 3 tuntia (kuvio 17A). Koska US2 on se geeni, joka ottaa osaa luokan I -raskasketjuekspression vähentämiseen US2 - US5 -lokuksessa, luokan I -raskasketjujen odotettiin sisältävän korkean turnovernopeuden stabiilisti transfektoiduissa US2-proteiinia ekspressoivissa solulinjoissa verrattuna U373-MG-emosoluihin ja negatiivisiin verrokkisolulinjoihin. Tämän ennustuksen testaamiseksi kunkin tyypin edustavat solulinjat pulssileimattiin metabolisesti radioaktiivisiksi 0,5 tunnin ajan ^{35}S-metioniini/kysteiini-alustassa ja sitten ne joko kerättiin välittömästi tai kylmäleimattiin leimattomassa alustassa eri aikoja ennen keräystä. Immuunisaostuskokeet, joissa käytettiin pulssi-kylmäleimausuutoksia osoittivat, että luokan I -raskasketjut olivat stabiileja (puoli-ikä > 3,5 tuntia) U373-MG-emosoluissa ja negatiivisessa verrokkisolulinjassa 55-212 (kuvio 17B, kaistat 1 - 4 ja 5 - 8, vastaavasti). Tälle päinvastaisesti, luokan I -raskasketjuilla oli hyvin lyhyt puoli-ikä US2-proteiinia ekspressoivassa solulinjassa 55-310 (kuvio 17B, kaistat 9 - 12), jonka osoitti se, että raskasketjut havaittiin ainoastaan pulssileimausnäytteessä.

Viitteet

1. Alford, C. A., and W. J. Britt. 1990. Cytomegalovirus, p. 1981-2010. In D. M. Knipe and B. N. Fields (ed.), Virology, 2nd ed. Raven press, New York.

2. Anderson, M., S. Paabo, T. Nilsson, and P. A. Peterson. 1985. Impaired intracellular transport of class I MHC antigens as a possible means for adenoviruses to evade immune surveillance. Cell 43:215-222.

3. Beck, S., and B. G. Barrell. 1988. Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class I antigens. Nature 331:269-272.

4. Beersma, M. F. C., M. J. E. Bijlmakers, and H. L. Ploegh. 1993. Human cytomegalovirus down-regulates HLA class I expression by reducing the stability of class I H chains. J. Immunol. 151:4455-4464.

5. Browne, H., M. Churcher, and T. Minson. 1992. Construction and characterization of a human cytomegalovirus mutant with the UL18 (class I homolog) gene deleted. J. Virol. 66:6784-6787.

6. Browne, H., G. Smith, S. Beck, and T. Minson. 1990. A complex between the MHC class I homolog encoded by human cytomegalovirus and β2 microglobulin. Nature 347:770-772.

7. Burgert, H. G., and S. Kvist. 1985. An adenovirus type 2 glycoprotein blocks cell surface expression of human histocompatibility class I antigens. Cell 41:987-997.

8. Campbell, A. E., J. S. Slater. 1994. Down-regulation of major histocompatibility complex class I synthesis by murine cytomegalovirus early gene expression. J. Virol. 68:1805-1811.

9. Campbell, A. E., J. S. Slater, V. J. Cavanaugh, and R. M. Stenberg. 1992. An early event in murine cytomegalovirus replication inhibits presentation of cellular antigens to cytotoxic T lymphocytes. J. Virol. 66:3011-3017.

10. Chee, M. S., A. T. Bankier, S. Beck, R. Bohni, C. M. Brown, R. Cerny, T. Horsnell, C. A. Hutchinson, T. Kouzarides, J. A. Martignetti, E. Preddie, S. C. Satchwell, P. Tomlinson, K. Weston, and B. G. Barrell. 1990. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 154:125-169.

11. Colberg-Poley, A. M., L. D. Santomenna, P. P. Harlow, P. A. Benfield, and D. J. Tenney. 1992. Human cytomegalovirus US3 and UL36-38 immediate-early

proteins regulate gene expression. J. Virol. 66:95-105.

12. del Val, M., K. Munch, M. Reddehasse, and U. Koszinowski. 1989. Presentation of CMV immediate-early antigen to cytotoxic T lymphocytes is selectively prevented by viral genes expressed in the early phase. Cell 58:305-315.

13. D'Urso, C.M., Z. Wang, Y. Cao, R. Tatake, R.A: Zeff, and S, Ferrone. 1991. Lack of HLA class I antigen expression by cultured melanoma cells FO-1 due to a defect in β2m gene expression. J. Clin. Invest. 87:284-292.

14. Elek, S. D., and H. Stern. 1974. Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection in utero. Lancet 1:1-5.

15. Gehrz, R. C., W. R. Christianson, K. M. Linner, K. E. Groth, and H. H. Balfour, Jr. 1980. Cytomegalovirus vaccine: specific humoral and cellular responses in human volunteers. Arch. intern. Med. 140:936-939.

16. Gilbert, M.J., S.R. Riddell, C-R. Li, and P.D. Greenberg. 1993. Selective interference with class I major histocompatibility complex presentation of the major immediate-early protein following infection with human cytomegalovirus. J. Virol. 67:3461-3469.

17. Gooding, L.R. 1992. Virus proteins that counteract host immune defenses. Cell 71:5-7.

18. Gretch, D. R., and M. F. Stinski. 1990. Transcription of the human cytomegalovirus glycoprotein gene family in the short unique component of the viral genome. Virology 174:522-532.

19. Jones, T.R., and Muzithras, V.P. 1991. Fine mapping of transcripts expressed from the US6 gene family of human cytomegalovirus strain AD169. J. Virol. 65:2024-2036.

20. Jones, T.R., and V.P. Muzithras. 1992. A cluster of dispensable genes within the human cytomegalovirus genome short component: IRS1, US1 through US5, and the US6 family. J. Virol. 66:2541-2546.

21. Jones, T.R., V.P. Muzithras, and Y. Gluzman. 1991. Replacement mutagenesis of the human cytomegalovirus genome: US10 and US11 gene products are nonessential. J. Virol. 65:5860-5872.

22. Jones, T.R., L. Sun, G.A. Bebernitz, V.P. Muzithras, H-J. Kim, S.H. Johnston, and E.Z. Baum. 1994. Proteolytic activity of human cytomegalovirus UL80

protease cleavage site mutants. J. Virol. 68: 3742-3752.

23. Jonjic, S., M. de Val, G.M. Keil, M.J. Reddehasse, and U. Koszinowski. 1988. A nonstructural viral protein expressed by a recombinant vaccinia virus protects against lethal cytomegalovirus infection. J. Virol. 62:1653-1658.

24. Mavromara-Nazos, P., M. Ackerman, and B. Roizman. 1986. Construction and properties of a viable herpes simplex virus 1 lacking coding sequences of the alpha 47 gene. J. Virol 60:807-812.

25. McKnight, S. L. 1980. The nucleotide sequence and transcript map of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. Nucl. Acids Res. 8:5949-5964.

26. Oram, J. D., R. G. Downing, A. Akrigg, A. A. Dollery, C. J. Duggleby, G. W. G. Wilkinson, and P. J. Greenaway. 1982. Use of recombinant plasmids to investigate the structure of the human cytomegalovirus genome. J. Gen. Virol. 59:111-129.

27. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

28. Schwartz, R.H. 1985. T lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. Ann. Rev. Immunol. 3:237-261.

29. Starr, S. E., J. P. Glazer, H. M. Friedman, J. D. Farquhar, and S. A. Plotkin. 1981. Specific cellular and humoral immunity after immunization with live Towne strain cytomegalovirus vaccine. J. Infect. Dis. 143:585-589.

30. Tenney, D.J., and A.M. Colberg-Poley. 1991. Human cytomegalovirus UL36-38 and US3 immediate-early genes: temporally regulated expression of nuclear, cytoplasmic, and polysome-associated transcripts during infection. J. Virol. 65:6724-6734.

31. Tenney, D.J., L.D. Santomenna, K.B. Goudie, and A.M. Colberg-Poley. 1993. The human cytomegalovirus US3 immediate-early protein lacking the putative transmembrane domain regulates gene expression. Nucl. Acids Res. 21:2931-2937.

32. Wentworth, B. B., and French, L. 1979. Plaque assay of cytomegalovirus strains of human origin. Proc. Soc. Exp. Biol., Med. 135:253-258.

33. Weston, K. 1988. An enhancer element in the short unique region of human

cytomegalovirus regulates the production of a group of abundant immediate early transcripts. Virology 162:406-416.

34. Weston, K., and B.G. Barrell. 1986. Sequence of the short unique region, short repeats, and parts of the long repeats of human cytomegalovirus. J. Mol. Biol. 192:177-208.

35. Yamashita, Y., K. Shimokata, S. Mizuno, H. Yamaguchi, and Y. Nishiyama. 1993. Down-regulation of the surface expression of class I MHC antigens by human cytomegalovirus. Virology 193:727-736.

36. Yamashita, Y., Shimokata, K., Saga, S., Mizuno, S. Tsurumi, T., and Nishiyama, Y. 1994. Rapid degradation of the heavy chain of class I major histocompatibility complex antigens in the endoplasmic reticulum of human cytomegalovirus-infected cells. J. Virol. 68:7933-7943.

37. York, I.A., C. Roop, D.W. Andrews, S.R. Riddell, F.L. Graham, and D.C. Johnson. 1994. A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8+ T lymphocytes. Cell 77:525-535.

37. Zinkernagel, R.M., and P.C. Doherty. 1980. MHC restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T cell restriction specificity. Adv. Immunol. 27:51-177.

Patenttivaatimukset

1. Sytomegaloviruksen (HCMV) rekombinanttimutantti, joka ei aiheuta solun pääasiallisen histokompatibiliteettikompleksin (MHC) ekspression vähenemistä infektion aikana, t u n n e t t u siitä, että se sisältää genomin, josta sellainen geenisekvenssi, joka kykenee vähentämään MHC luokan I ekspressiota, on deletoitu, jossa deletoitu geenisekvenssi sisältää alueen, joka sisältää avoimen lukuraamin US2.

2. Menetelmä pääasiallisen histokompatibiliteettikompleksin (MHC) luokan I ekspression vähenemisen säätelemiseksi sytomegaloviruksella infektoituneessa solussa, t u n n e t t u siitä, että se sisältää vaiheet, joissa:

(a) tunnistetaan geenisekvenssi sytomegaloviruksen genomin alueella, joka sisältää avoimen lukuraamin US2, joka kykenee vähentämään MHC luokan I ekspressiota; ja

(b) deletoidaan tunnistettu geenisekvenssi sytomegaloviruksen genomista.

3. Farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se sisältää sytomegaloviruksen (HCMV) rekombinanttimutantin, joka ei vähennä solun pääasiallisen histokompatibiliteettikompleksin (MHC) ekspressiota infektion aikana, joka sisältää genomin, josta on deletoitu sellainen geenisekvenssi, joka kykenee vähentämään MHC luokan I -ekspressiota, jossa deletoitu geenisekvenssi sisältää alueen, joka sisältää avoimen lukuraamin US2.

4. Rokotekoostumus käytettäväksi sytomegalovirusinfektioiden ehkäisemiseksi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää tehokkaan määrän sytomegaloviruksen (HCMV) rekombinanttimutanttia, joka ei vähennä solun pääasiallisen histokompatibiliteettikompleksin (MHC) ekspressiota infektion aikana, joka sisältää genomin, josta on deletoitu sellainen geenisekvenssi, joka kykenee vähentämään MHC luokan I ekspressiota, jossa deletoitu geenisekvenssi si-

sältää alueen, joka sisältää avoimen lukuraamin US2, farmaseuttisesti hyväksyttävässä vehikkelissä.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen rokotekoostumus, t u n n e t t u siitä, että se sisältää edelleen adjuvantin.

6. Koostumus, joka on käyttökelpoinen immunisoitaessa yksilö sytomegalovirusta vastaan, t u n n e t t u siitä, että se sisältää immunogeenisen määrän sytomegaloviruksen (HCMV) rekombinanttimutanttia, joka ei vähennä solun pääasiallisen histokompatibiliteettikompleksin (MHC) ekspressiota infektion aikana, joka sisältää genomin, josta on deletoitu sellainen geenisekvenssi, joka kykenee vähentämään MHC luokan I -ekspressiota, jossa deletoitu geenisekvenssi sisältää alueen, joka sisältää avoimen lukuraamin US2.

7. Koostumus, joka on käyttökelpoinen ehkäisemään tai vähentämään yksilön herkkyyttä akuutille sytomegaloviruksselle, t u n n e t t u siitä, että se sisältää immunogeenisen määrän sytomegaloviruksen (HCMV) rekombinanttimutanttia, joka ei vähennä solun pääasiallisen histokompatibiliteettikompleksin (MHC) ekspressiota infektion aikana, joka sisältää genomin, josta on deletoitu sellainen geenisekvenssi, joka kykenee vähentämään MHC luokan I ekspressiota, jossa deletoitu geenisekvenssi sisältää alueen, joka sisältää avoimen lukuraamin US2.

8. Virusperusteinen geeniterapiavektori, t u n n e t t u siitä, että se sisältää geenisekvenssin ihmisen sytomegaloviruksen genomin avoimesta lukuraamista US2.

Heterogeenisen liitos-
alueen A sekvenssi

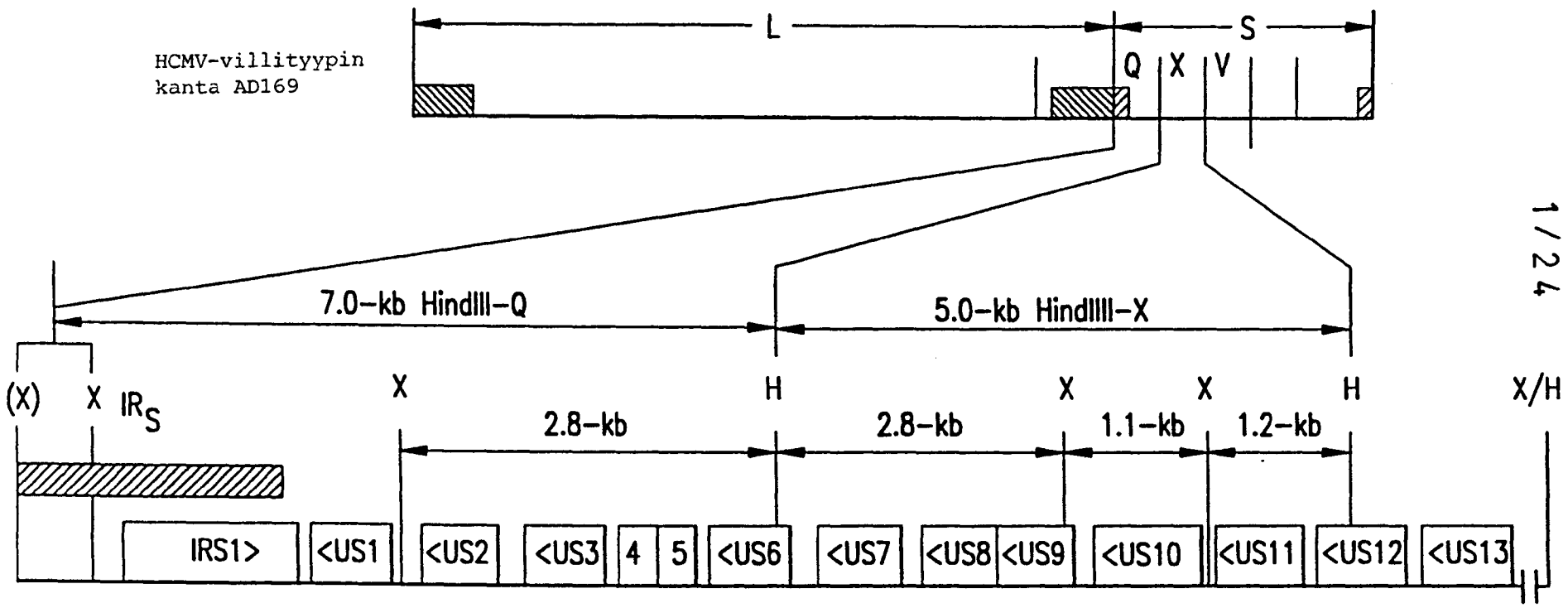
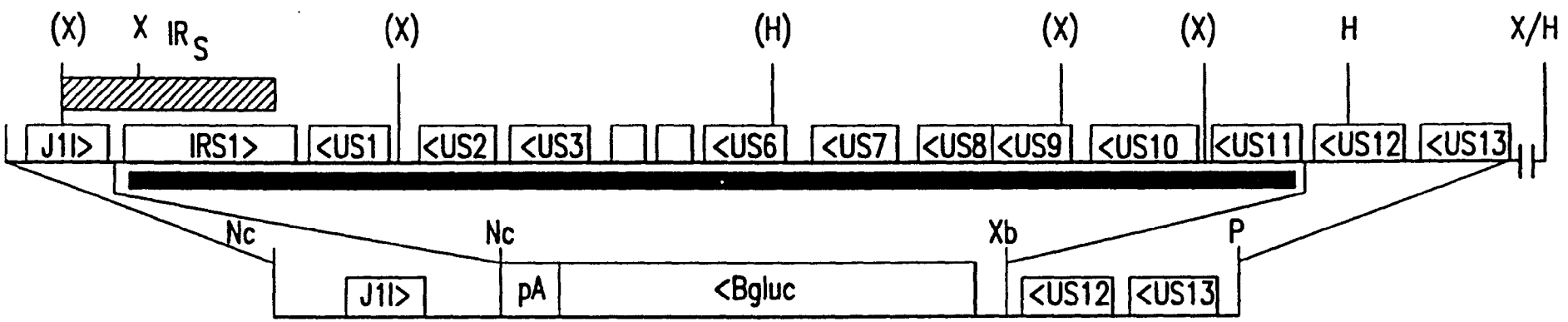


FIG. 1A



RV7186 (IRS1-US11 deletoitu)

FIG. 1B

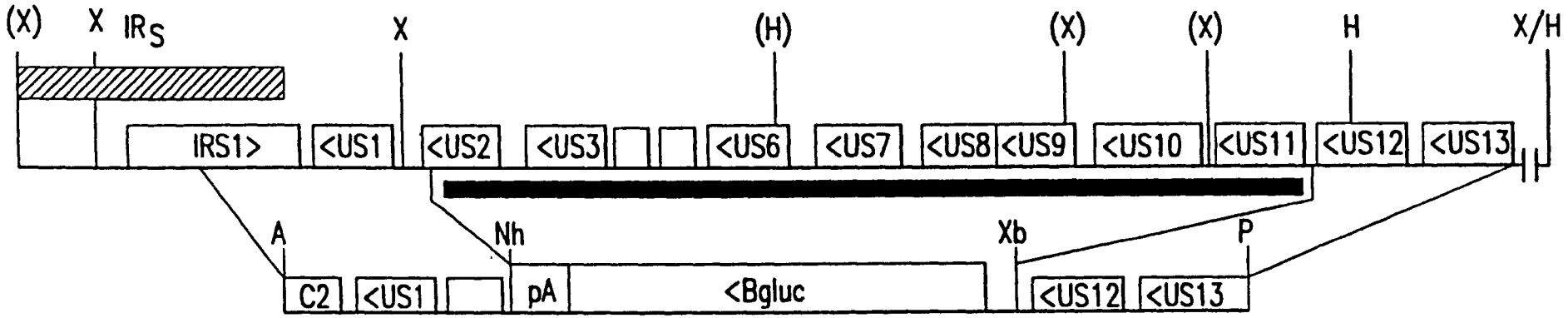


FIG. 1C

RV798 (US2-US11 deletoitu)

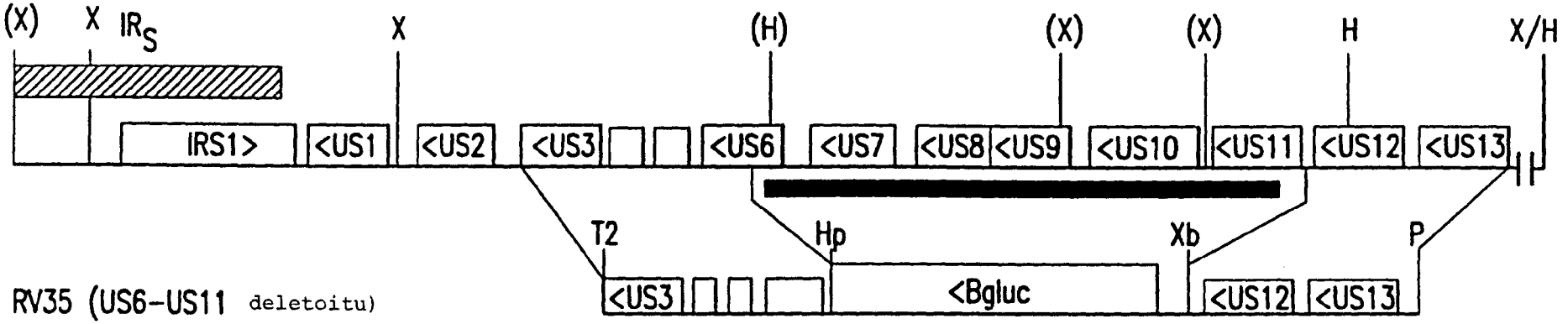

(X)
X
IRS
X
(H)
(X)
(X)
H
X/H
IRS1>
<US1
<US2
<US3
<US6
<US7
<US8
<US9
<US10
<US11
<US12
<US13
T2
Hp
Xb
P
<US3
<Bgluc
<US12
<US13
RV35 (US6-US11 deletoitu)

FIG. 1D

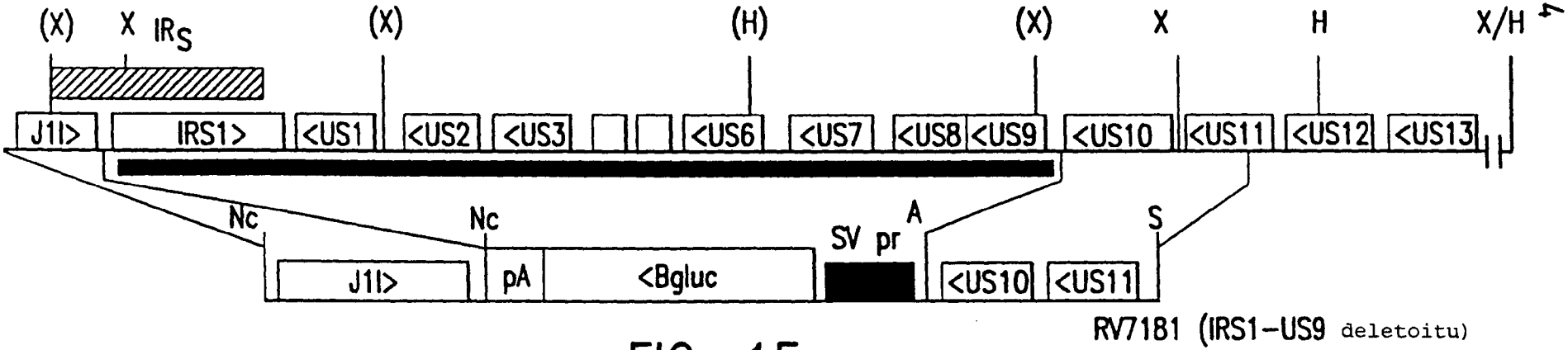
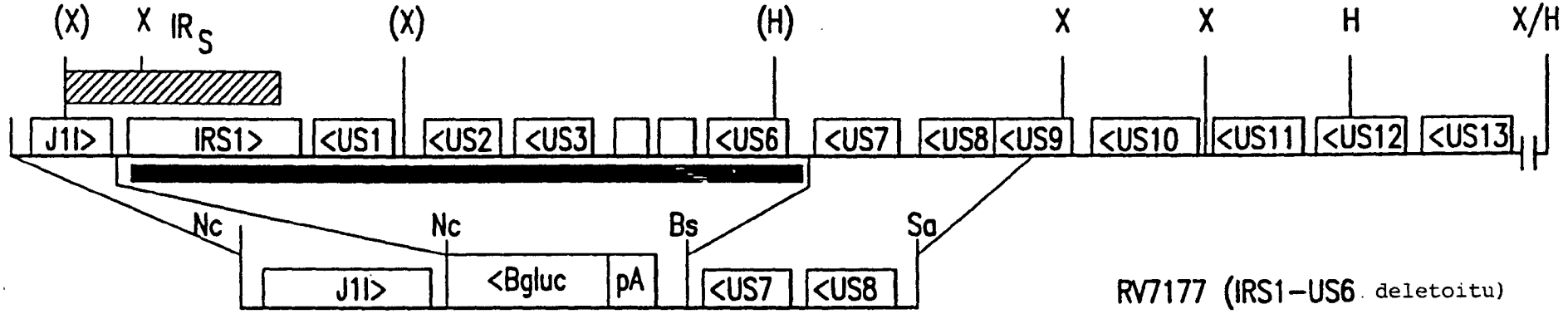
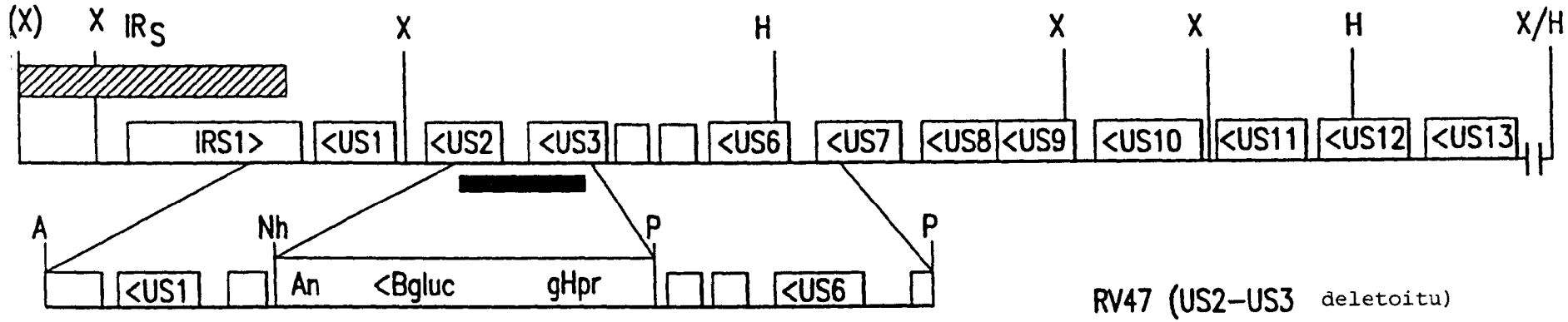

(X)
X
IRS
(X)
(H)
(X)
X
H
X/H
J1I>
IRS1>
<US1
<US2
<US3
<US6
<US7
<US8
<US9
<US10
<US11
<US12
<US13
Nc
Nc
SV pr
A
S
J1I>
pA
<Bgluc
<US10
<US11
RV7181 (IRS1-US9 deletoitu)

FIG. 1E



RV7177 (IRS1–US6 deletoitu)

FIG. 1F



RV47 (US2–US3 deletoitu)

FIG. 1G

28.01.97 97028

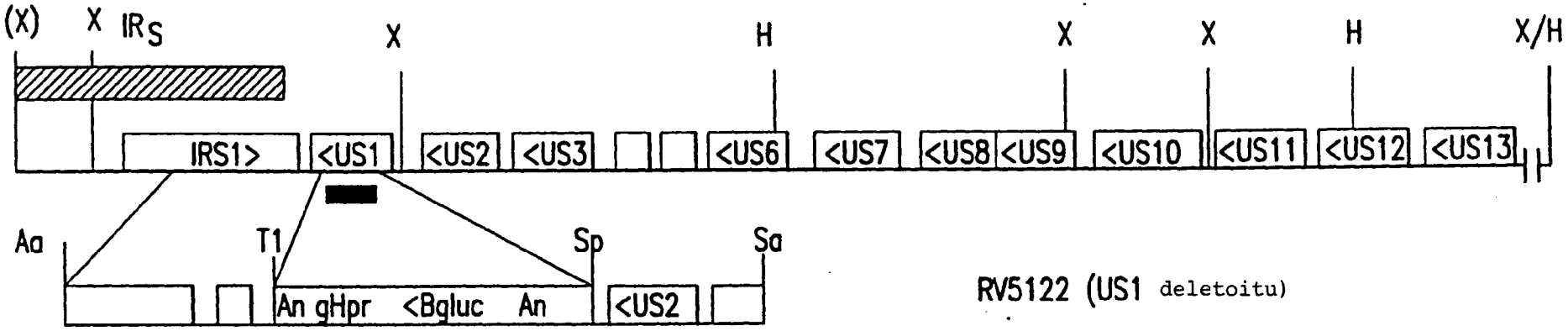


FIG. 1H

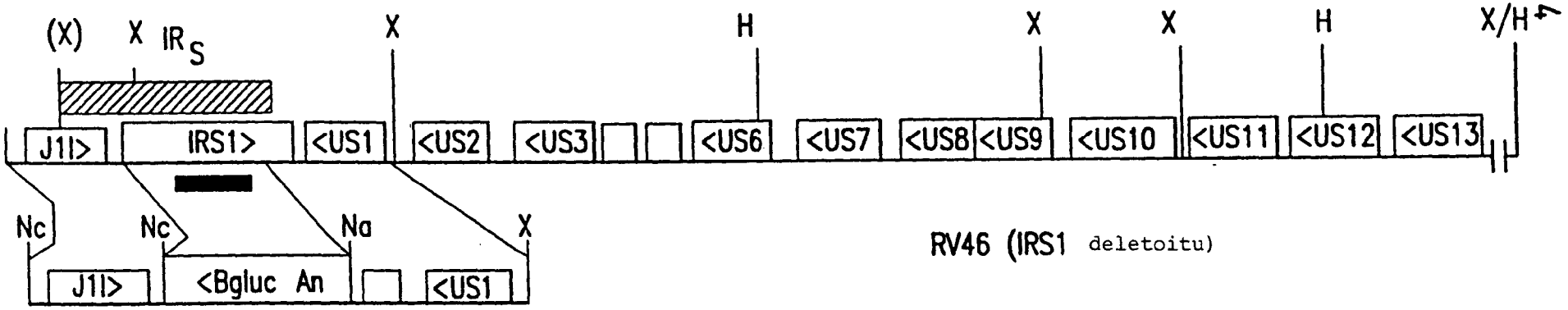


FIG. 1I

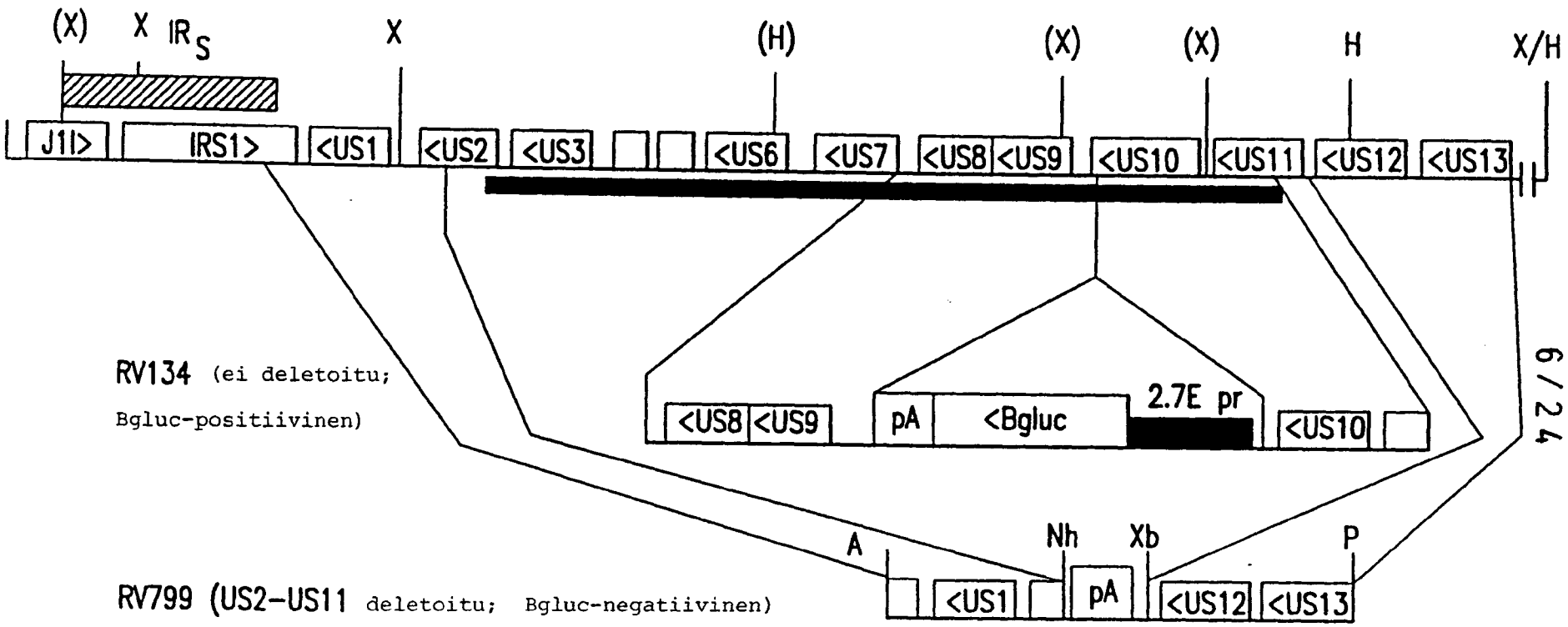

(X)
X
IRS
X
(H)
(X)
(X)
H
X/H
J1I>
IRS1>
<US1
<US2
<US3
<US6
<US7
<US8
<US9
<US10
<US11
<US12
<US13
RV134 (ei deletoitu;
Bgluc-positiivinen)
<US8
<US9
pA
<Bgluc
2.7E pr
<US10
A
Nh
Xb
P
RV799 (US2-US11 deletoitu; Bgluc-negatiivinen)
<US1
pA
<US12
<US13
6/24

FIG.1J

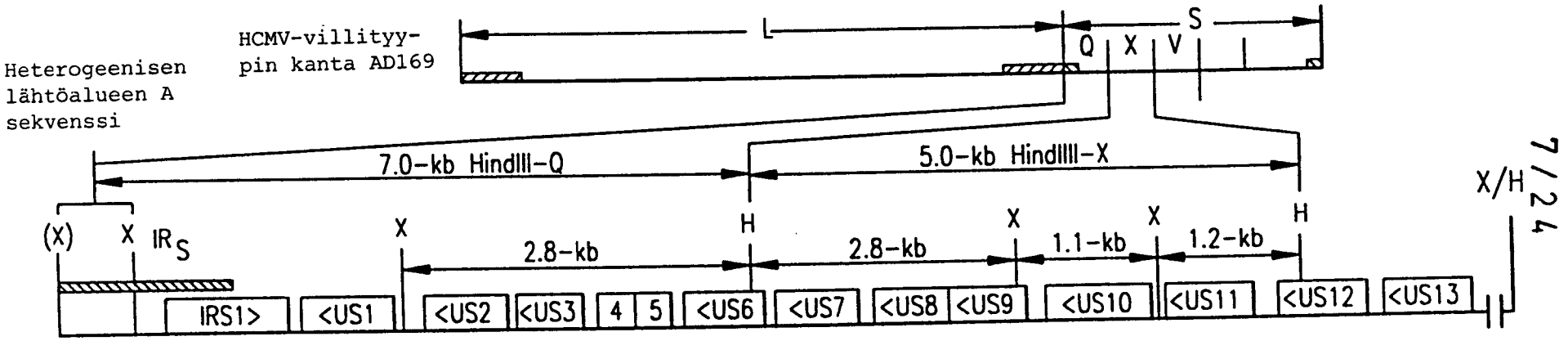
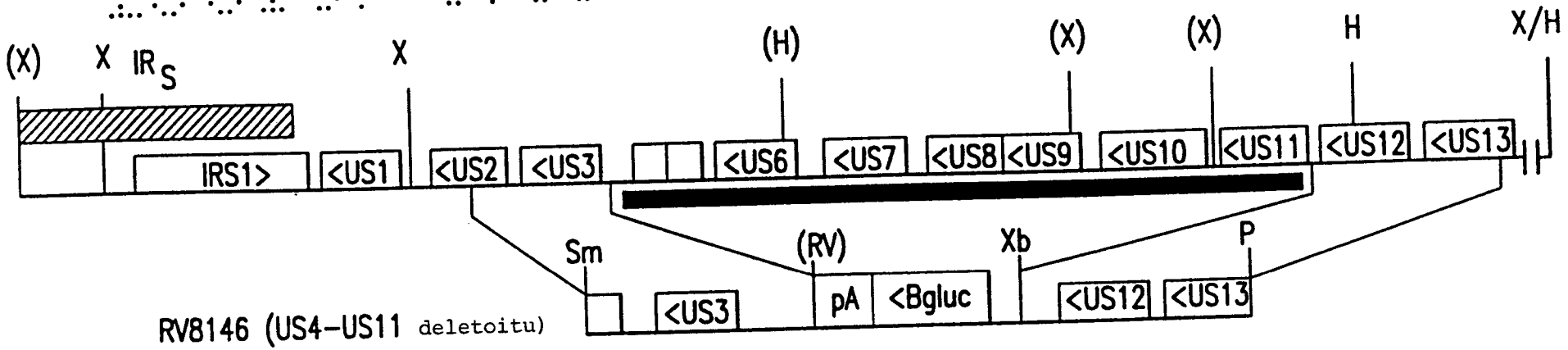

Heterogeenisen lähtöalueen A sekvenssi
HCMV-villityy-pin kanta AD169
L
S
Q
X
V
7.0-kb HindIII-Q
5.0-kb HindIII-X
X/H
(X)
X
IRS
X
H
X
X
H
2.8-kb
2.8-kb
1.1-kb
1.2-kb
IRS1>
<US1
<US2
<US3
4
5
<US6
<US7
<US8
<US9
<US10
<US11
<US12
<US13

FIG.2A



RV8146 (US4-US11 deletoitu)

FIG. 2B

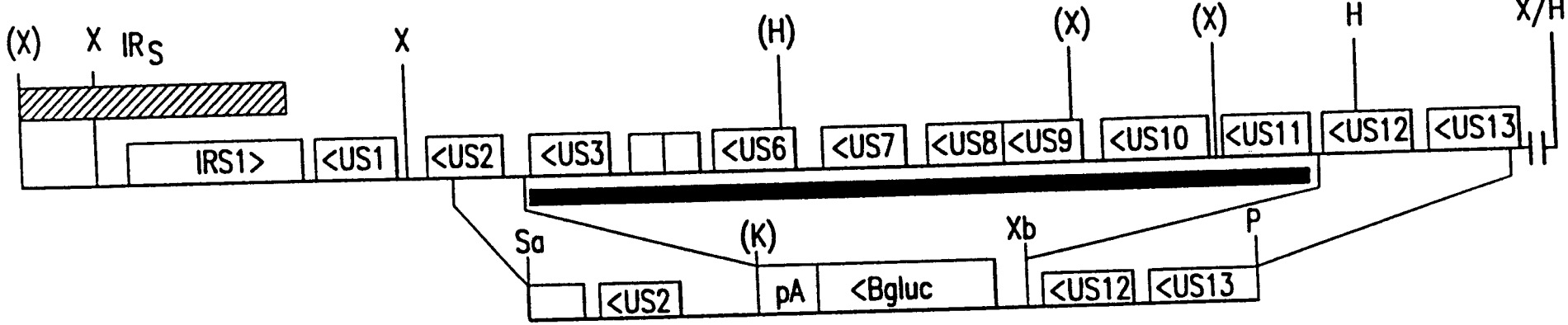


FIG. 2C

RV8173 (US3-US11 deletoitu)

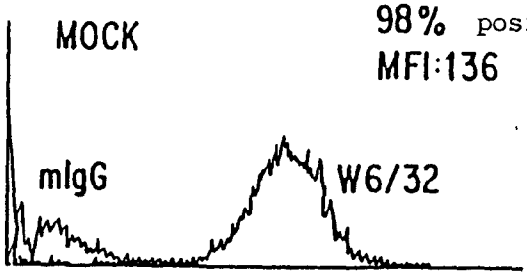


FIG.3A

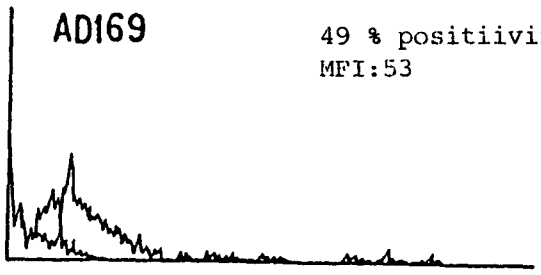


FIG. 3B

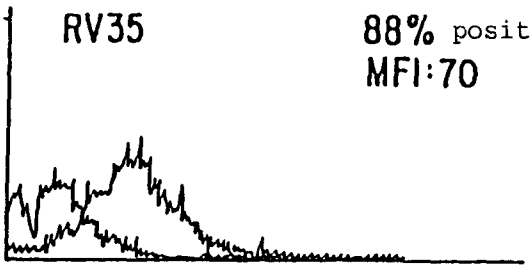


FIG. 3C

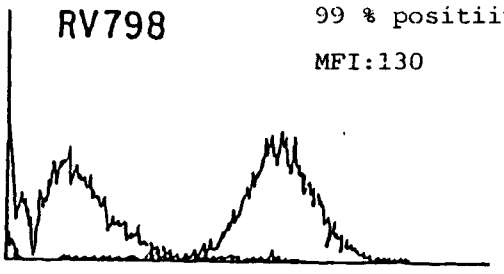


FIG. 3D

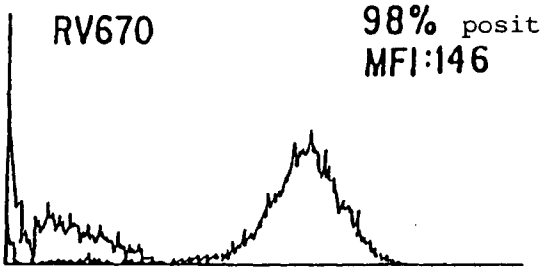


FIG. 3E

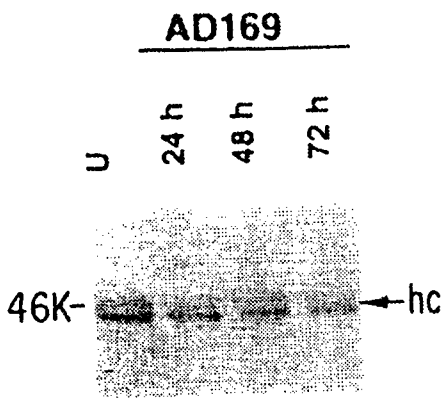


FIG. 4A

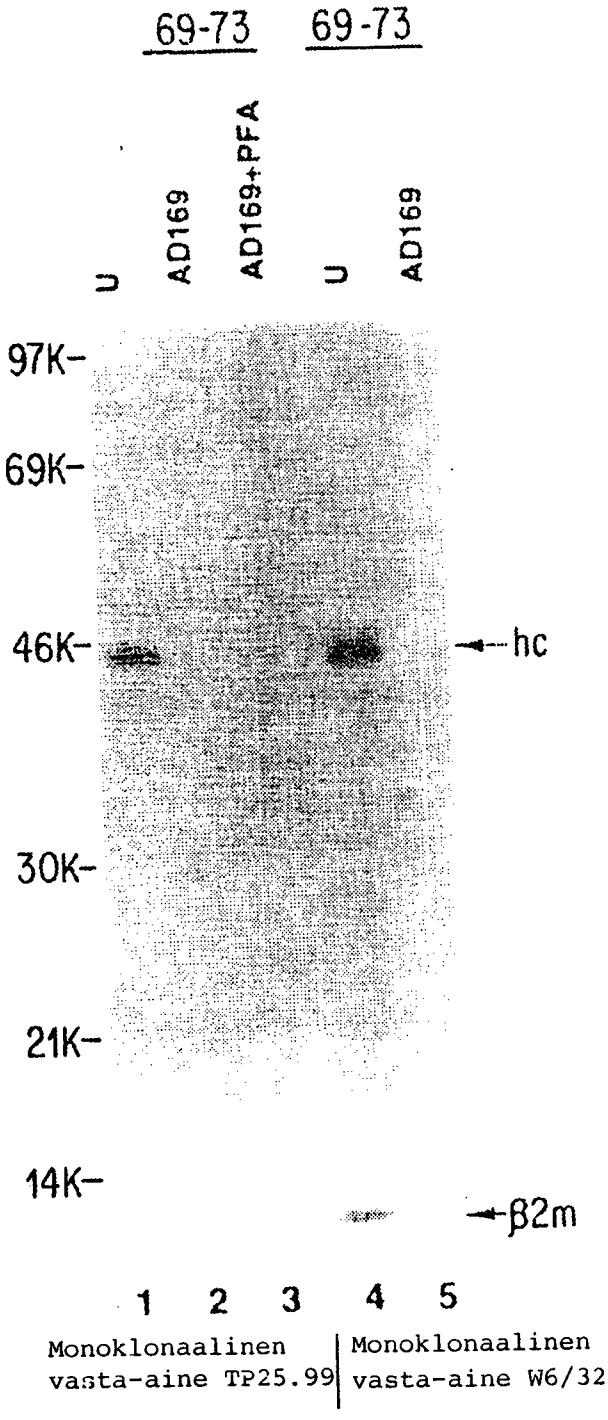


FIG. 4B

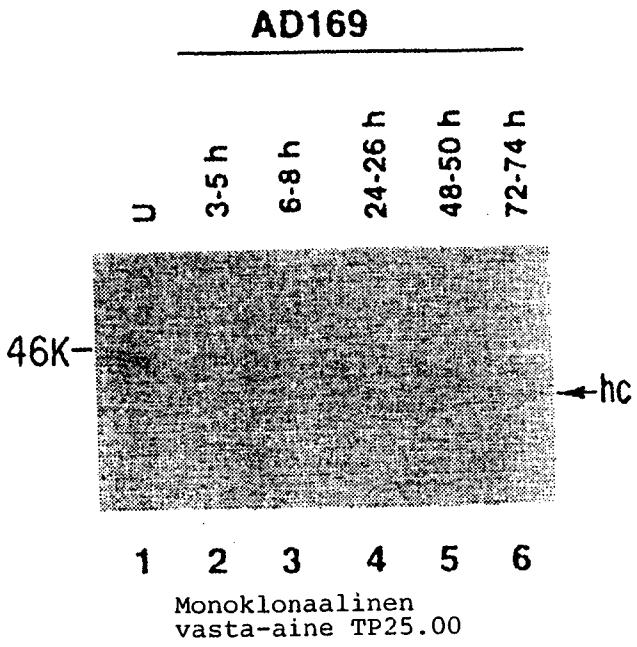


FIG. 4C

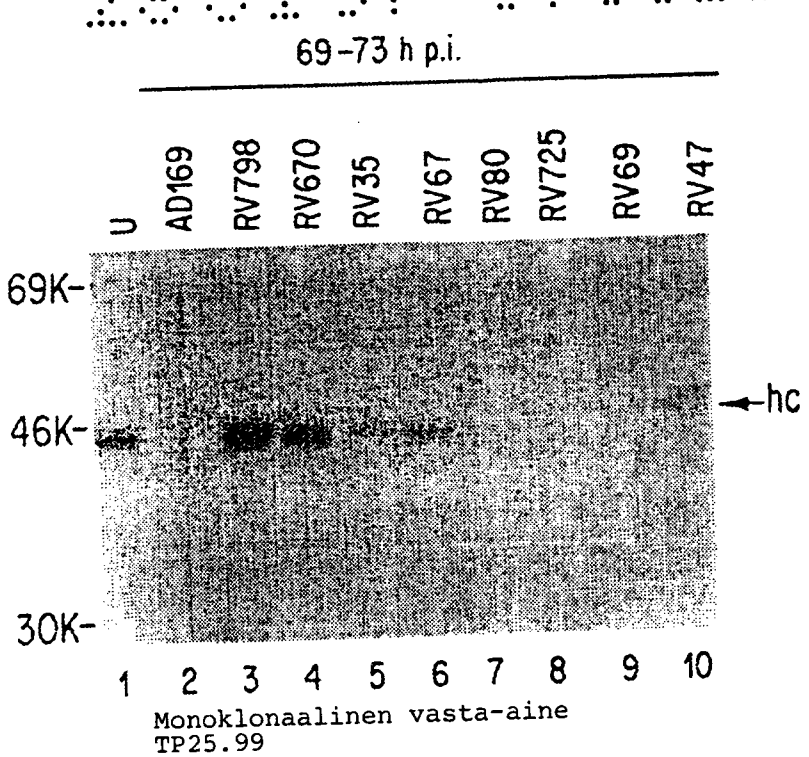


FIG. 5A

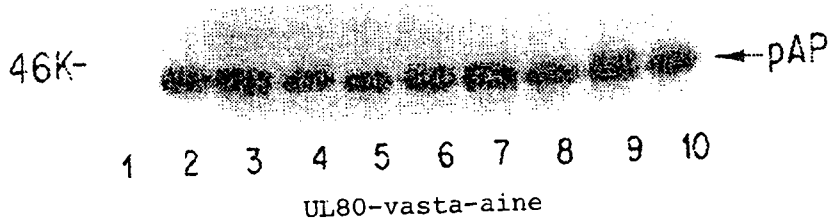


FIG. 5C

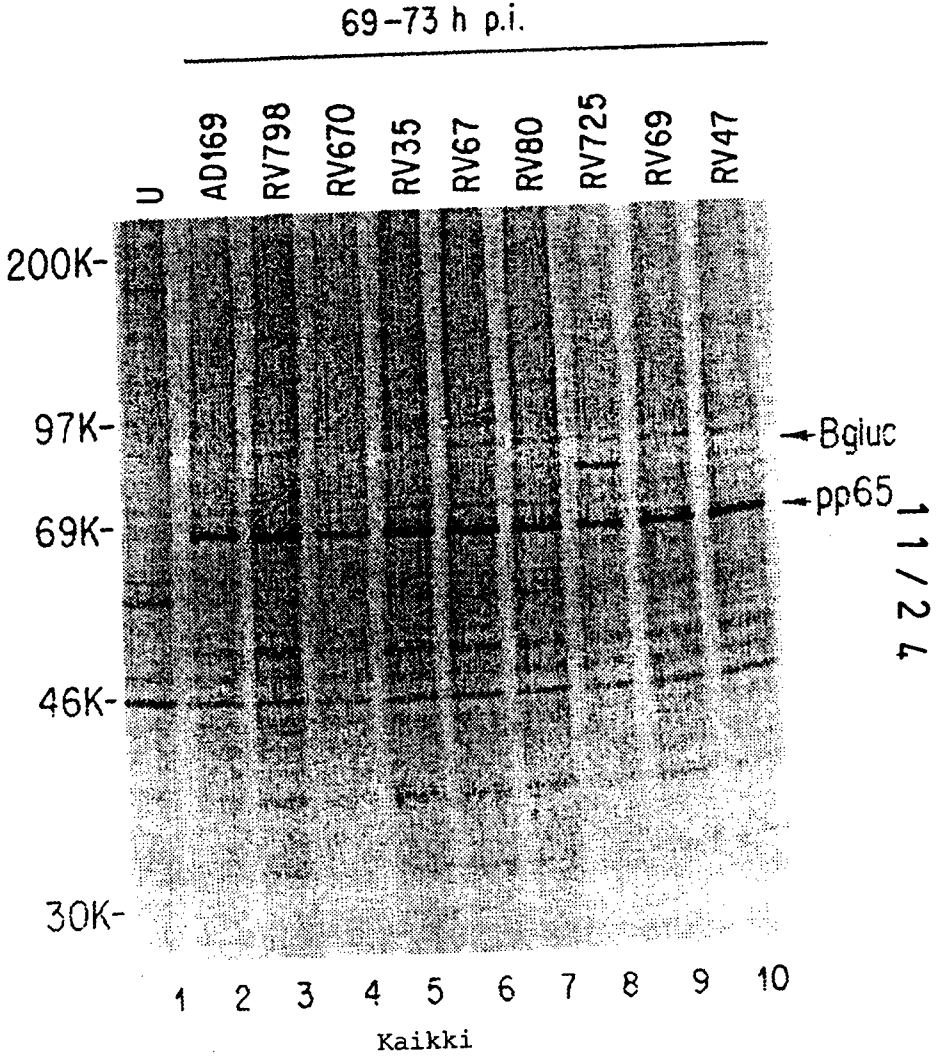


FIG. 5B

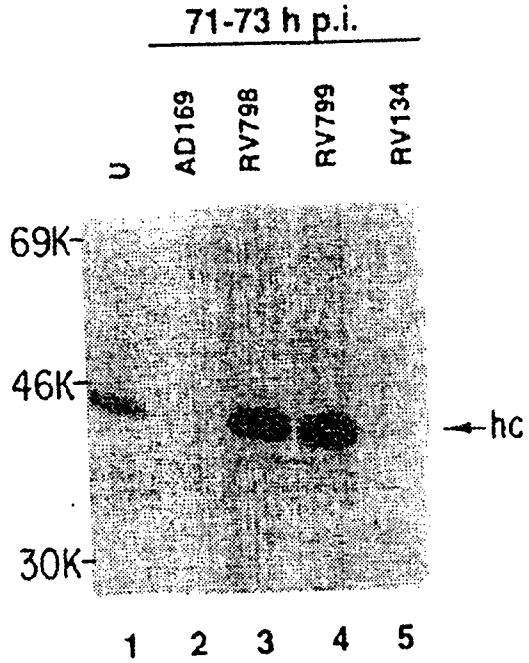


FIG. 6A

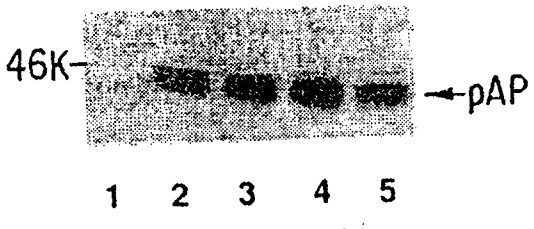


FIG. 6C

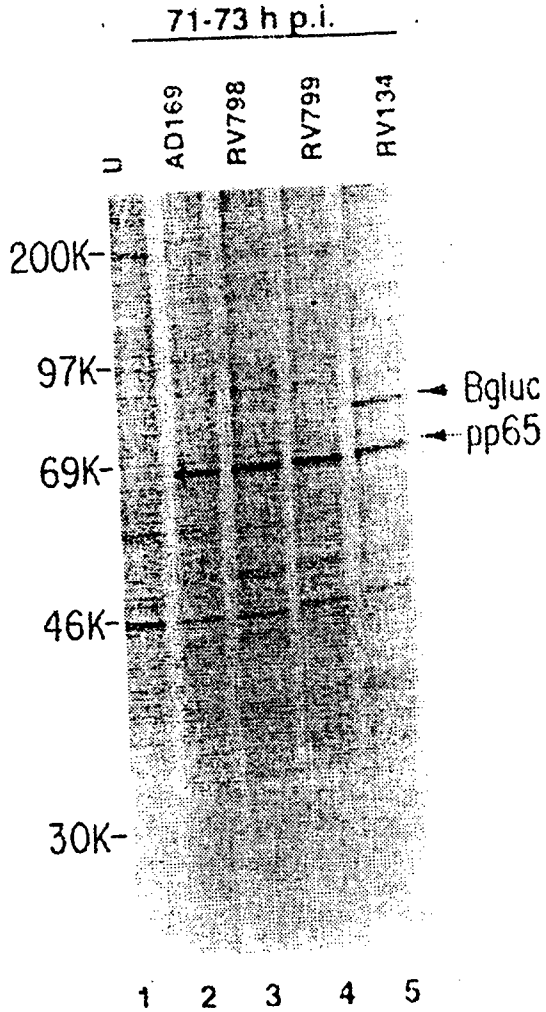


FIG. 6B

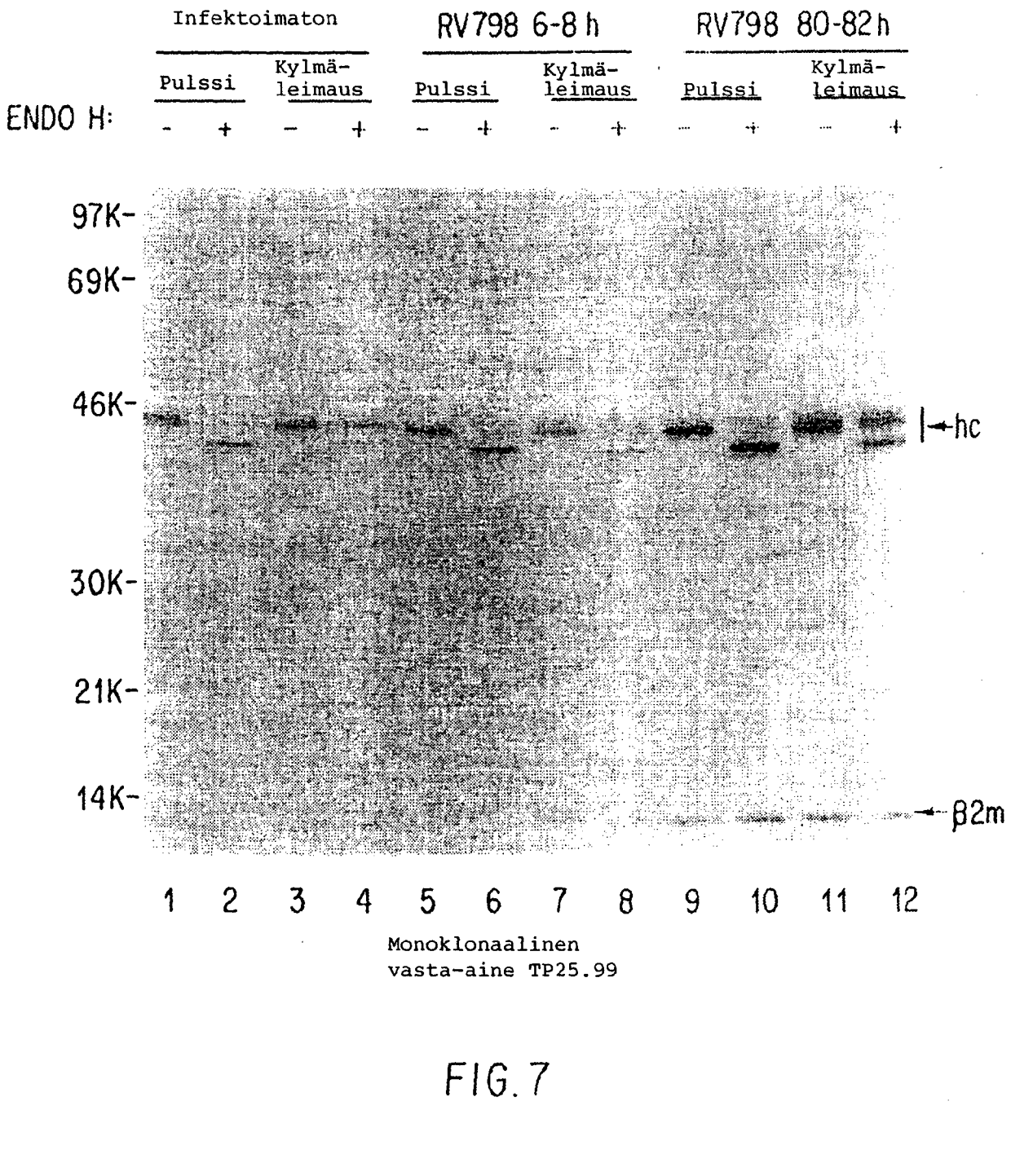

Infektoimaton
RV798 6-8 h
RV798 80-82 h
Pulssi
Kylmä-leimaus
Pulssi
Kylmä-leimaus
Pulssi
Kylmä-leimaus
ENDO H:
- + - + - + - + - + - +
97K-
69K-
46K-
30K-
21K-
14K-
hc
β2m
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Monoklonaalinen
vasta-aine TP25.99

FIG. 7

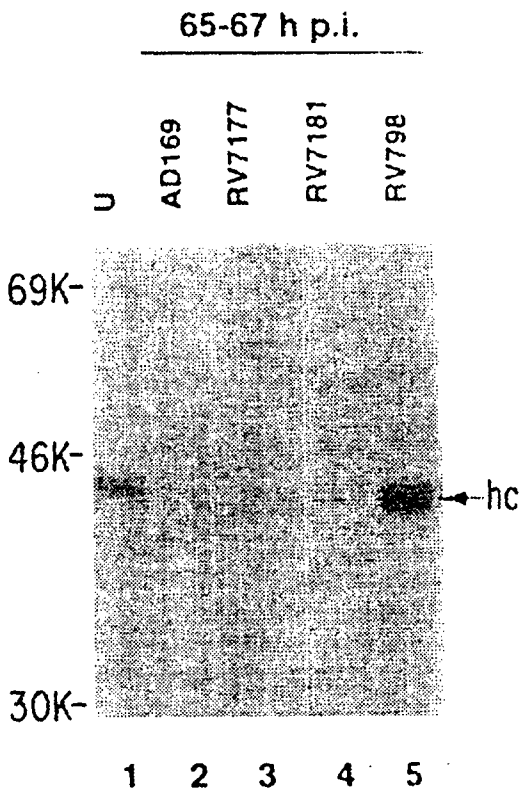


FIG. 8A

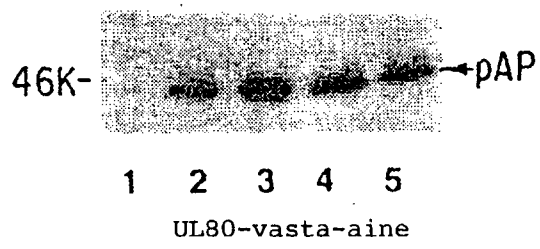


FIG. 8C

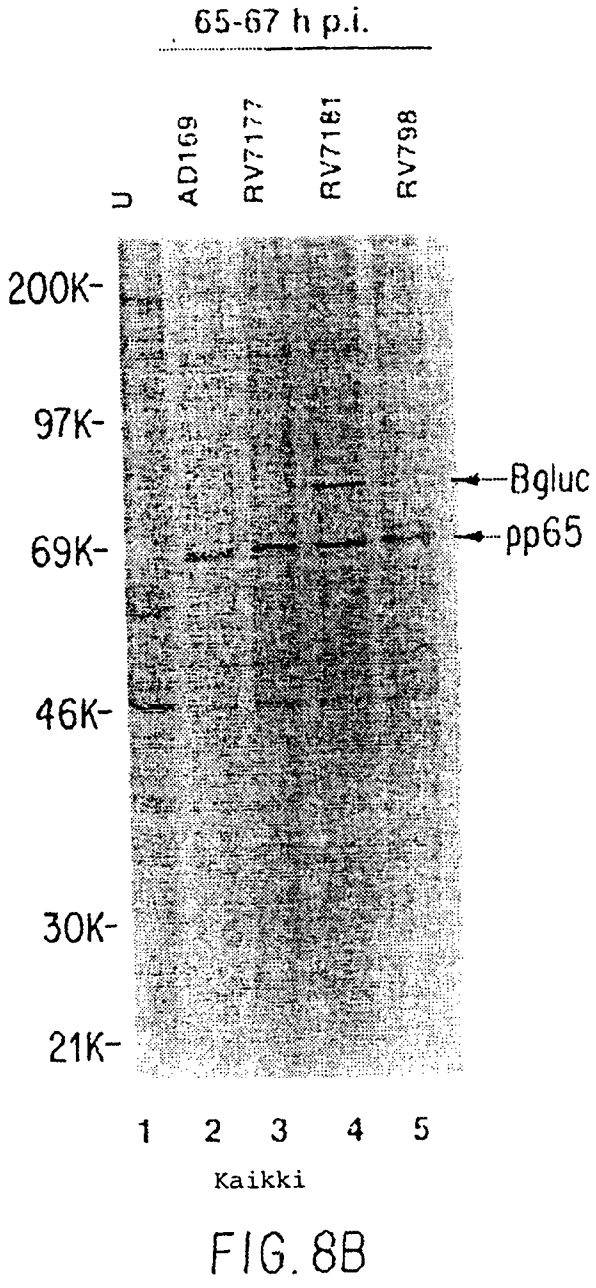
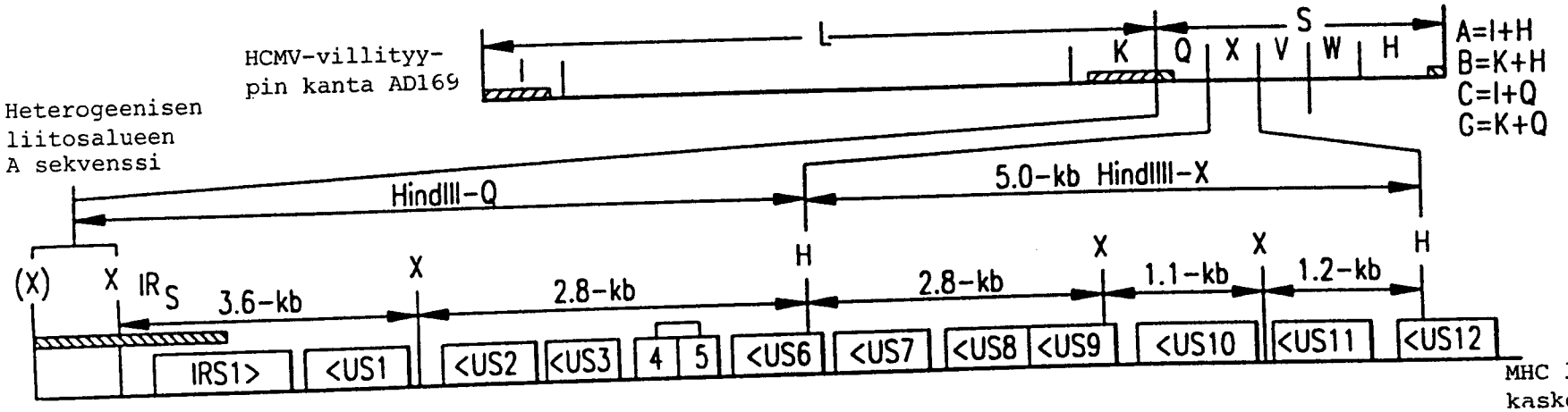


FIG. 8B



Virus	MHC luokan I -raskasketjuekspression väheneminen
AD169 (WT)	Kyllä
RV670	Ei
RV35	Kyllä
RV67	Kyllä
RV80	Kyllä
RV725	Kyllä
RV69	Kyllä
RV47	Kyllä
RV5122	Kyllä
RV46	Kyllä
RV798	Ei
RV7181	Kyllä
RV7177	Kyllä
RV7186	Ei

FIG.9

Tehty läpäiseväksi

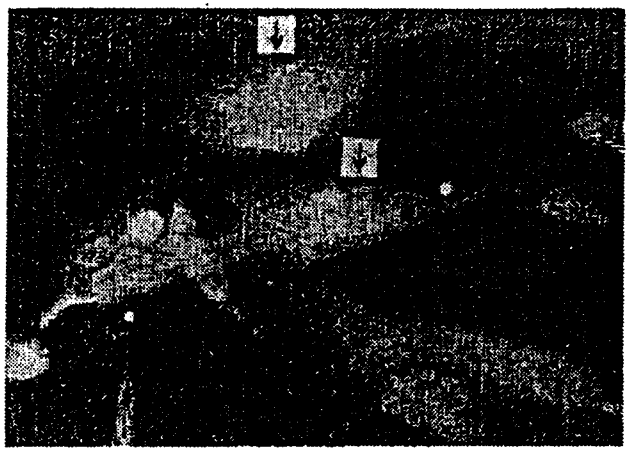


FIG.10A

AD169 (WT) 8h p.i.

Ei tehty läpäiseväksi

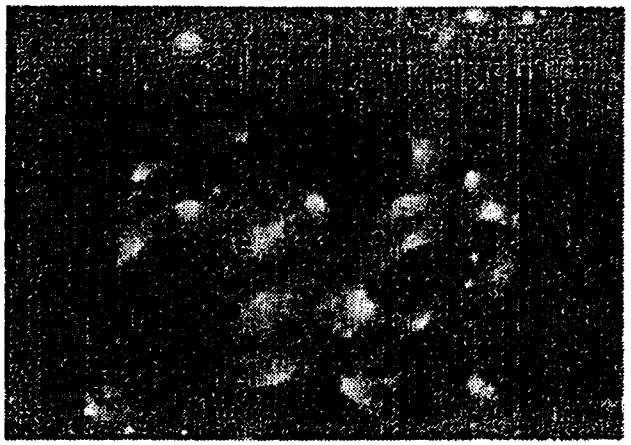


FIG.10B

AD169 (WT) 8h p.i.



FIG.10C

RV699 8h p.i.

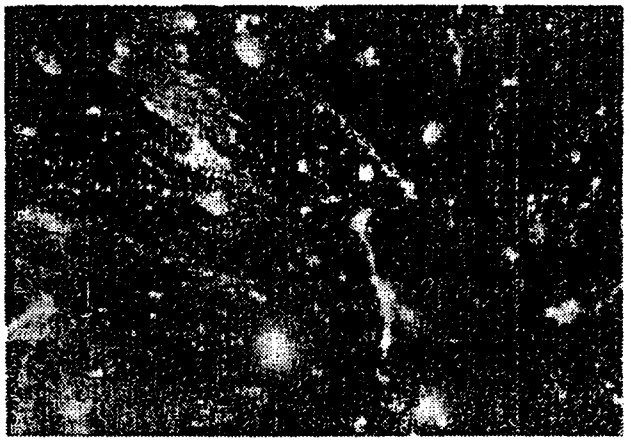
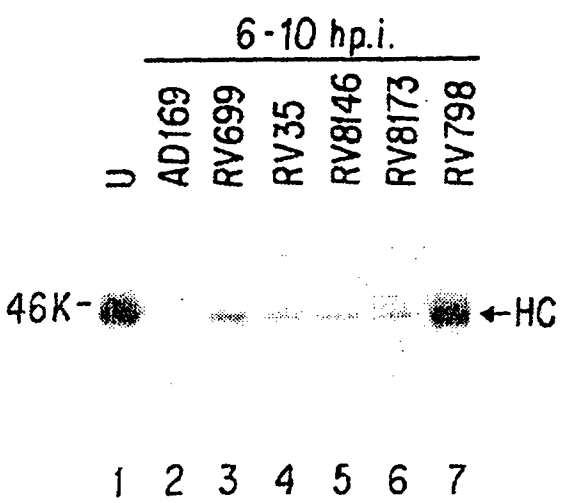


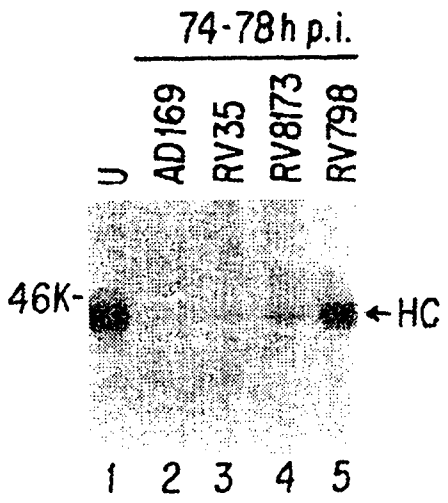
FIG.10D

RV699 8h p.i.



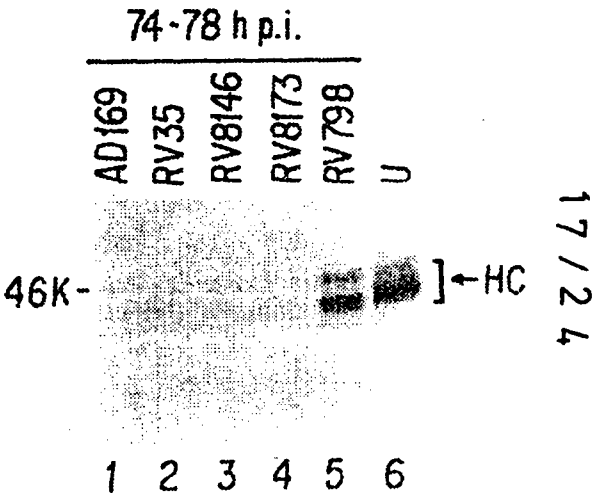
Monoklonaalinen vasta-aine TP25.99

FIG. 11A



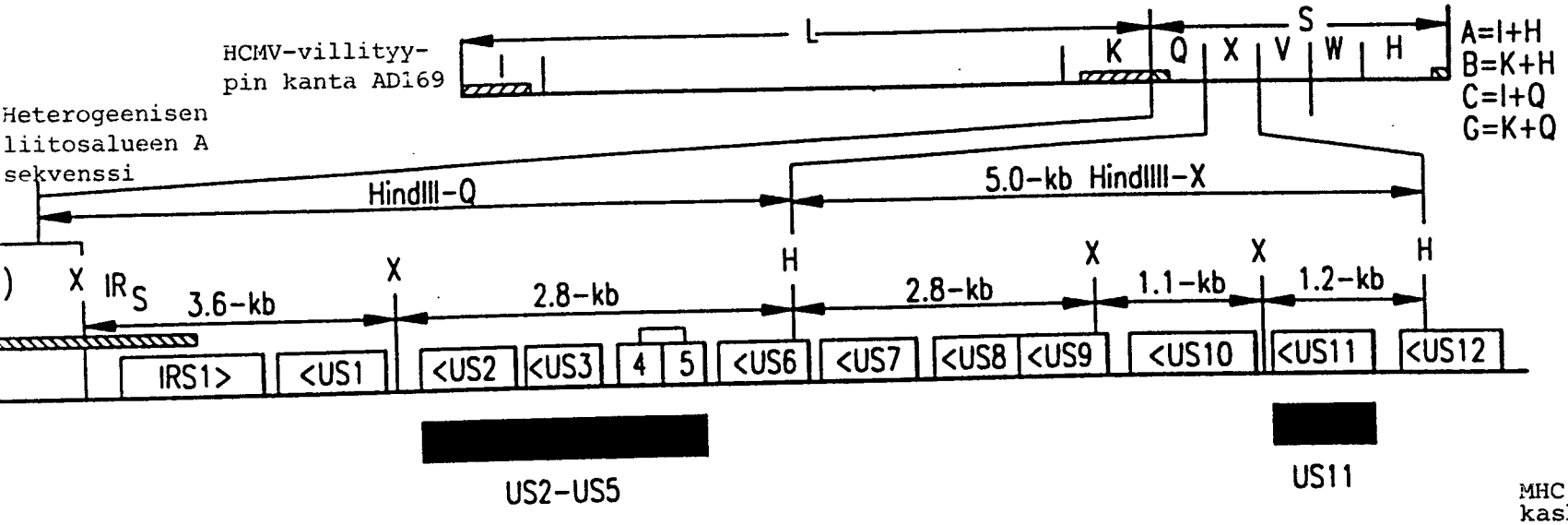
Monoklonaalinen vasta-aine TP25.99

FIG. 11B



Monoklonaalinen vasta-aine TP25.99

FIG. 11C



VIRUS	MHC luokan I -raskasketjuekspression väheneminen
AD169(WT)	Kyllä
RV798	EI
RV699	Kyllä
RV35	Kyllä
RV8146	Kyllä
RV8173	Kyllä

FIG.12

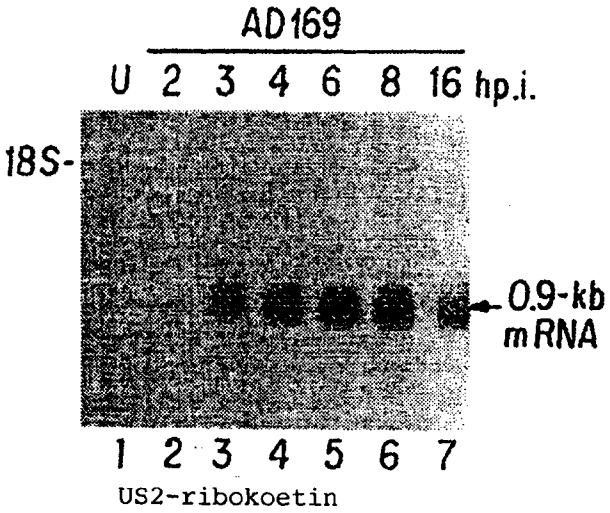


FIG. 13A

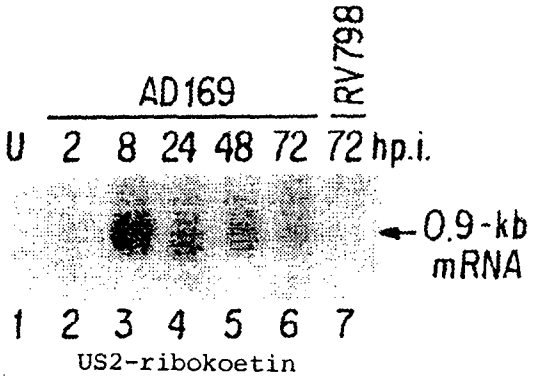


FIG. 13B

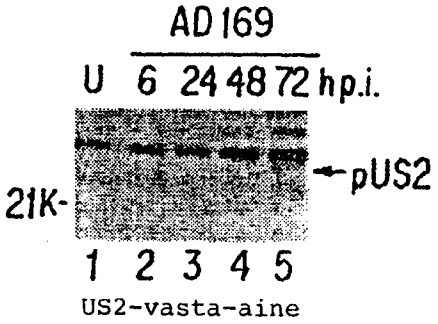


FIG. 13C

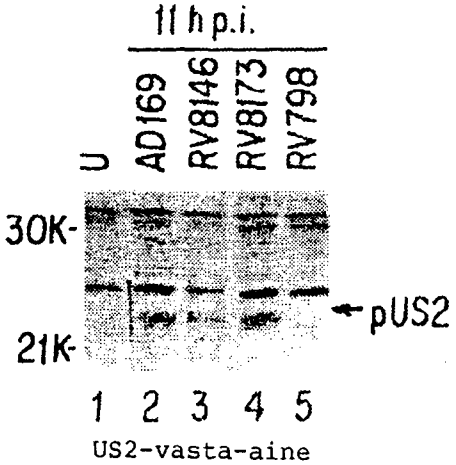
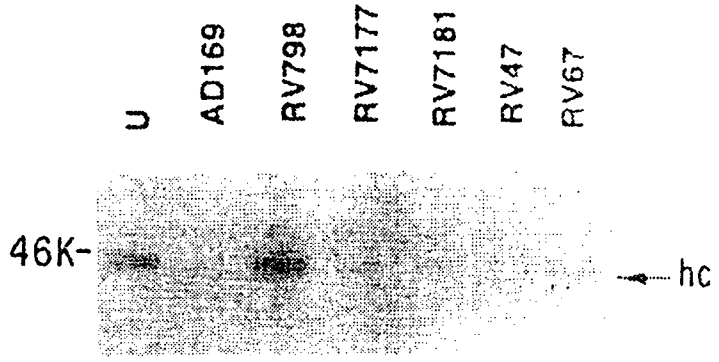


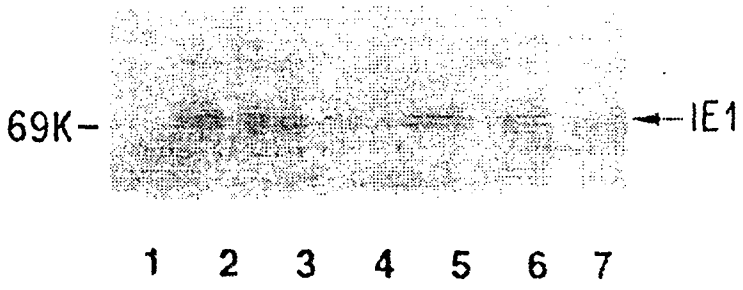
FIG. 13D

6-10 h p.i.



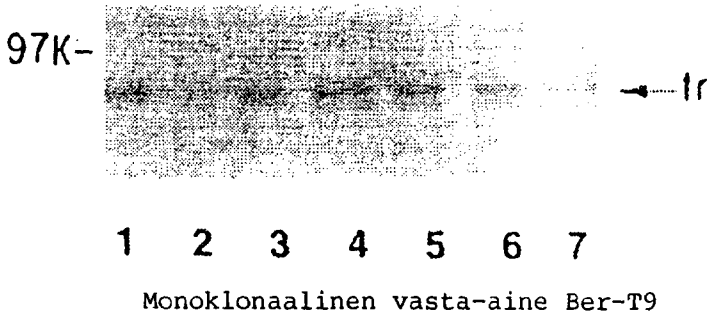
Monoklonaalinen vasta-aine TP25.99

FIG. 14A



Monoklonaalinen vasta-aine IE1

FIG. 14B



Monoklonaalinen vasta-aine Ber-T9

FIG. 14C

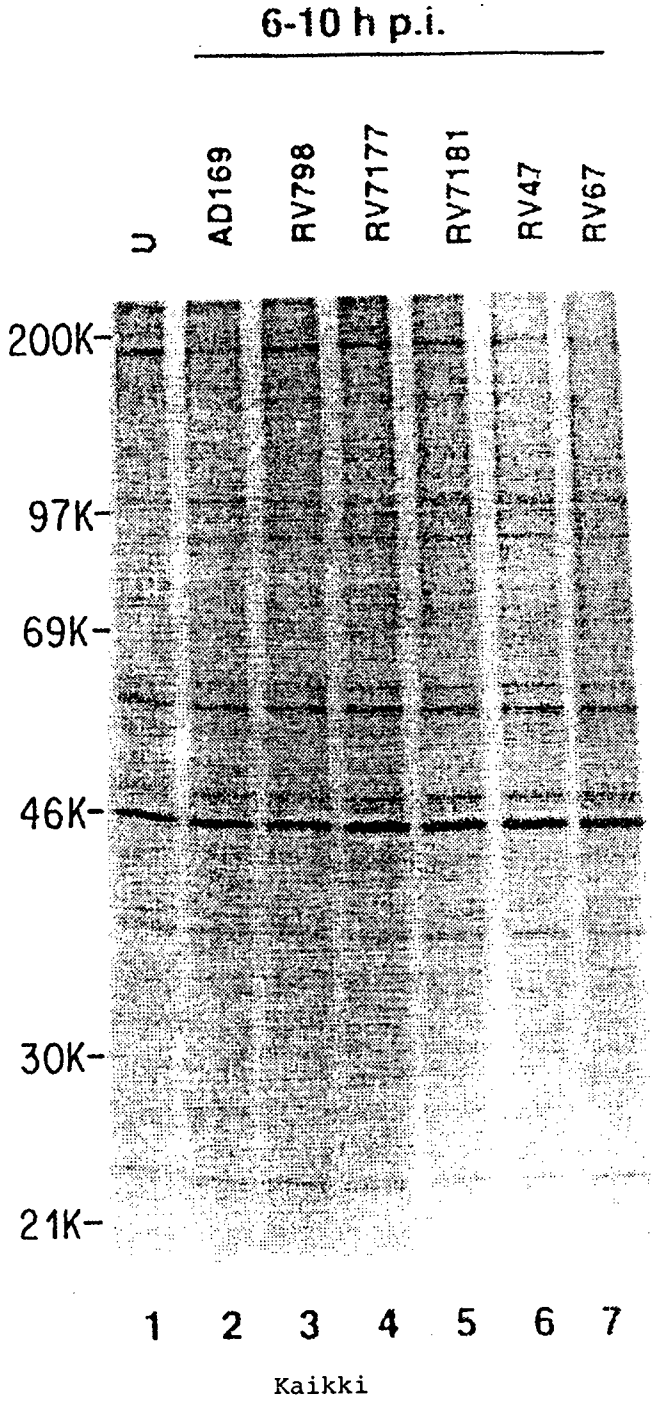

6-10 h p.i.
U
AD169
RV798
RV7177
RV7181
RV47
RV67
200K-
97K-
69K-
46K-
30K-
21K-
1 2 3 4 5 6 7
Kaikki

FIG. 14D

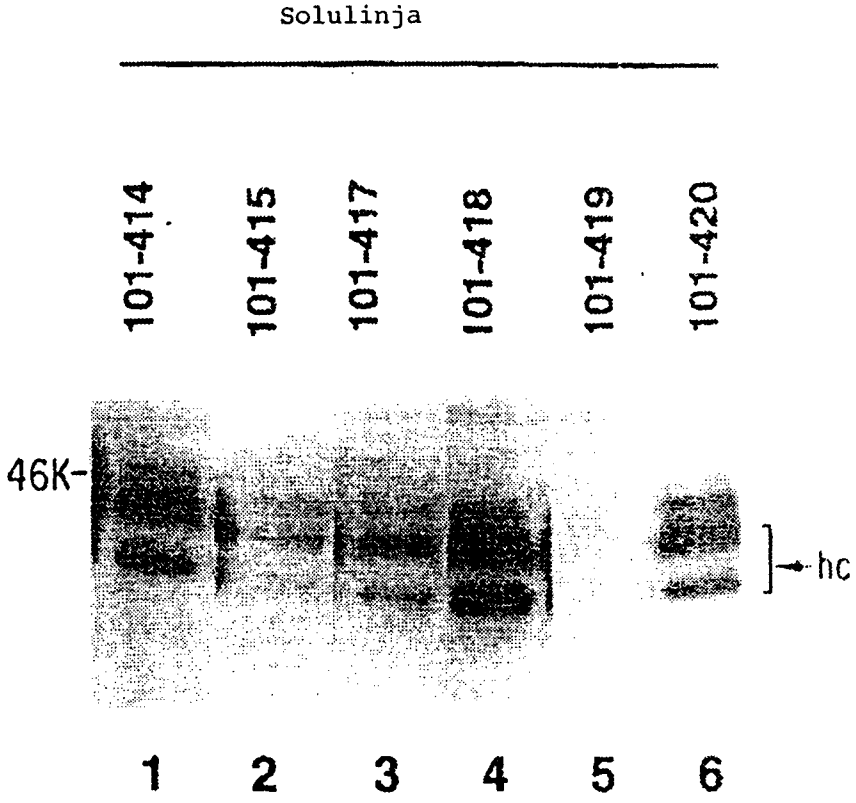


FIG. 15A

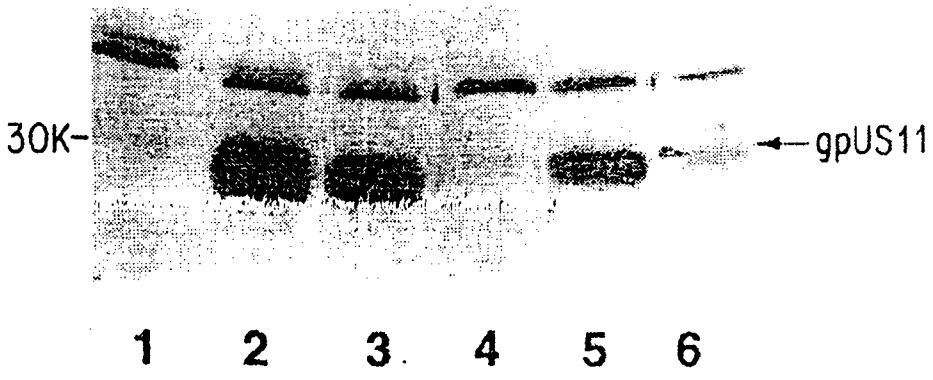


FIG. 15B

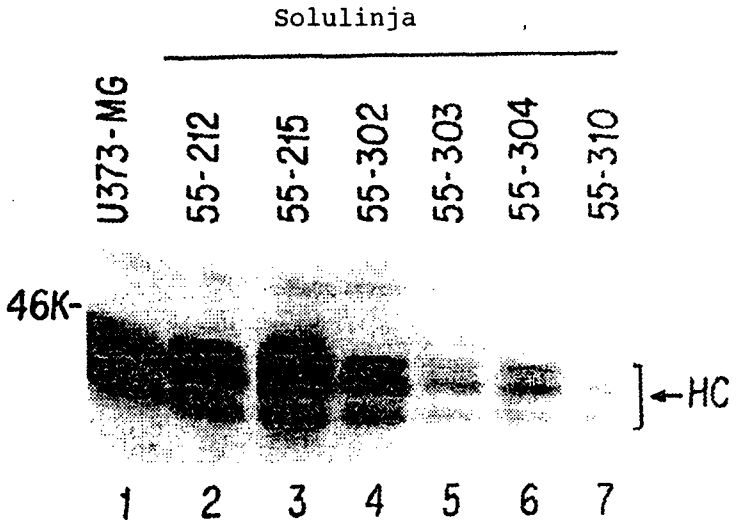


FIG. 16A

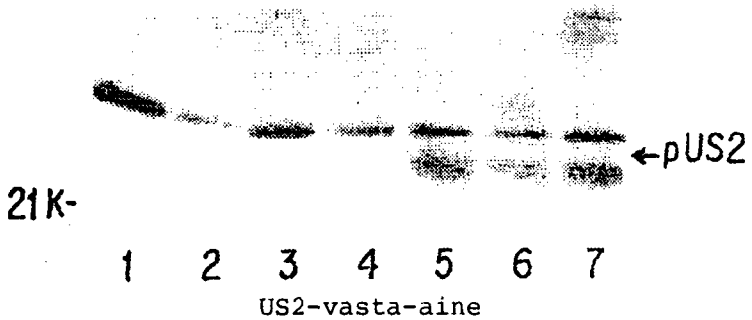
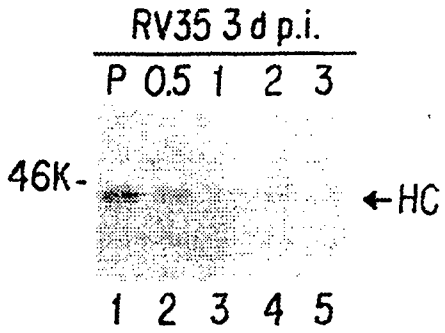
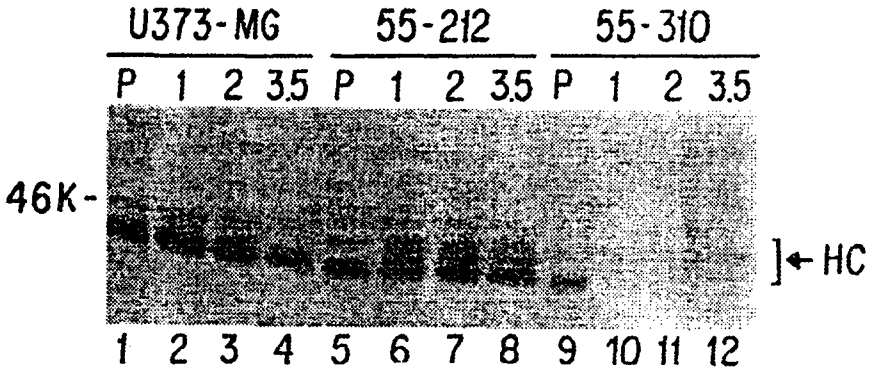


FIG. 16B



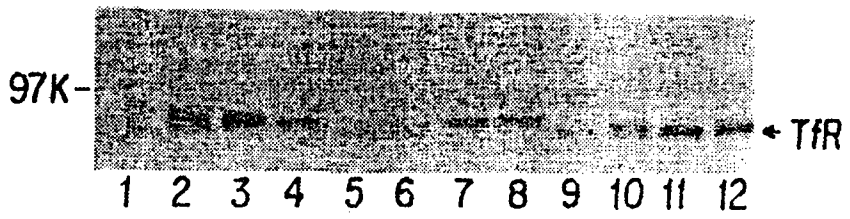
Monoklonaalinen vasta-aine TP25.99

FIG. 17A



Monoklonaalinen vasta-aine TP25.99

FIG. 17B



Monoklonaalinen vasta-aine Ber-T9

FIG. 17C