



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 235 669 A1

4(51) C 12 N 15/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 274 447 3	(22)	26.03.85	(44)	14.05.86
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD
(72)	Liebscher, Dierck-Hartmut, Dr. sc. nat.; Pöhlmann, Christoph, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Rößler, Helga, Dr. rer. nat. Dipl.-Biochem.; Merkel, Dieter, Dipl.-Ing.; Pfeifer, Monika, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Rosenthal, Sinaida, Prof. Dr. sc. med., DD

(54)	Verfahren zur Herstellung eines BLV-kodierten Hüllproteins
------	--

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren der Herstellung eines BLV (Bovines Leukämievirus) – kodierten Hüllproteins oder von dessen Derivaten in einem transformierten Wirt, bevorzugt in *E. coli*. Das Ziel besteht darin, ein gentechnisches Verfahren zur Herstellung der genannten Proteine bereitzustellen, wobei das gewinnbare BLV-Hüllprotein bzw. BLV-Hüllprotein-Derivat für die Diagnostik, Prophylaxe und/oder Therapie der enzootischen Rinderleukose einsetzbar ist. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß ein Wirt, bevorzugt *E. coli*, mit einem rekombinanten Plasmid, das aus einem Replikationsursprung, einer Expressionskontrolleinheit und einer für ein Hüllprotein oder Teilen davon kodierten BLV-Nukleotidsequenz besteht, transformiert wird, dieser Wirt isoliert und gezüchtet wird, und anschließend das BLV-kodierte Hüllprotein oder dessen Derivate aus der Kultur gewonnen werden. Die Erfindung kann in der mikrobiologischen Industrie, in der Veterinärmedizin und in der Tierproduktion angewendet werden.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung eines BLV-kodierten Hüllproteins oder dessen Derivaten in einem transformierten Wirt, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
 - a) einen solchen Wirt mit einem rekombinanten Plasmid, das mindestens aus einem Replikationsursprung, einer Expressionskontrollereinheit und einer für ein Hüllprotein oder Teilen davon kodierenden BLV-Nukleotidsequenz besteht, transformiert,
 - b) diesen Wirt isoliert und unter Bildung einer großen Population des Wirts züchtet und
 - c) das BLV-kodierte Hüllprotein oder dessen Derivate aus der Kultur gewinnt.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Wirt Mikroorganismen benutzt werden.
3. Verfahren nach den Punkten 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Wirt Bakterien, vorzugsweise E. coli, benutzt werden.
4. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die für das BLV-Hüllprotein kodierende BLV-Nukleotidsequenz aus natürlichen, synthetischen oder halbsynthetischen Nukleotidsequenzen stammt.
5. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die für ein BLV-Hüllprotein kodierende Nukleotidsequenz eine BLV-Nukleotidsequenz aus dem Lambda-BLV-Rekombinantenklon HU-1 (ZIMET-Nr. 11085) ist.
6. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die für ein BLV-Hüllprotein kodierende Nukleotidsequenz eine BLV-Nukleotidsequenz aus Plasmid-BLV-Rekombinanten-Klonen, die Restriktionsfragmente des Lambda-BLV-Rekombinantenklons HU-1 (ZIMET-Nr. 11085), enthalten ist.
7. Verfahren nach den Punkten 1, 5 und 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die für ein BLV-Hüllprotein kodierende Nukleotidsequenz, die sich vollständig auf einem HindIII-PvuII-2,6kB-Restriktionsfragment befindet, verwendet wird, wobei der N-Terminus 0,7kB vom HindIII-Ort, der C-Terminus des gp51-Hüllproteins 1,6kB vom HindIII-Ort und der C-Terminus des gp30-Hüllproteins 2,25kB vom HindIII-Ort des Fragmentes entfernt liegen.
8. Verfahren nach den Punkten 1, 5, 6 und 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß das HindIII-PvuII-2,6kB-BLV-Restriktionsfragment mit dem durch HindIII- und SmaI-geöffneten pLac-Expressionsvektor pUC19 durch T4-Ligase-Behandlung verbunden wird, wobei das Rekombinantenplasmid penv26 (ZIMET-Nr. 11062) entsteht.
9. Verfahren nach den Punkten 1, 5 und 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die für ein BLV-Hüllprotein kodierende Nukleotidsequenz, die sich zum Teil auf einem 2,0kB-BamHI-Restriktionsfragment befindet, verwendet wird, wobei ein BamHI-Restriktionsort 406 Nukleotide vom N-Terminus des Hüllproteins entfernt liegt und das Restriktionsfragment die BLV-Hüllprotein kodierende Nukleotidsequenz von dieser Position bis zum C-Terminus des Hüllproteins und darüber hinaus weitere BLV-Nukleotidsequenzen umfaßt.
10. Verfahren nach Punkten 1, 5, 6 und 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß das BamHI-2,0kB-BLV-Restriktionsfragment mit dem durch BamHI-geöffneten pLac-Expressionsvektor pUC13 durch T4-Ligase-Behandlung verbunden wird, wobei das Rekombinantenplasmid penv53 entsteht (ZIMET-Nr. 11061).
11. Verfahren nach Punkten 1, 5 und 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß Restriktionsfragmente verwendet werden, die einem Teil der BLV-Hüllprotein kodierenden Sequenz entsprechen und keine anderen BLV-Nukleotidsequenzen enthalten.
12. Verfahren nach Punkten 1, 5, 6 und 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein BglII-SmaI-0,63kB-Restriktionsfragment verwendet wird, wobei der BglII-Restriktionsort 0,26kB vom N-Terminus des Hüllproteins entfernt liegt und der SmaI-Ort sich 12 Nukleotide vor dem C-Terminus des gp51-BLV-Hüllproteins befindet.
13. Verfahren nach Punkten 1, 5, 6 und 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein BamHI-SmaI-0,48kB-Restriktionsfragment verwendet wird, wobei der BamHI-Restriktionsort 0,4kB vom N-Terminus des Hüllproteins entfernt liegt und der SmaI-Ort sich 12 Nukleotide vor dem C-Terminus des gp51-BLV-Hüllproteins befindet.
14. Verfahren nach Punkten 1, 5 bis 8 und 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß die dem N-Terminus des BLV-Hüllproteins vorausgehende und Nicht-Hüllprotein kodierende Sequenz durch Bal31-Exonuklease-Behandlung, ausgehend von einem Restriktionsort vor dem N-Terminus, entfernt wird.
15. Verfahren nach den Punkten 1 und 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß die dem N-Terminus des BLV-Hüllproteins vorausgehende Nukleotidsequenz durch Bal31-Exonuklease-Behandlung, ausgehend vom HindIII-Ort oder bevorzugt ausgehend vom 0,26kB vor dem N-Terminus liegenden XhoI-Ort, entfernt wird.
16. Verfahren nach Punkten 1, 5 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß die dem C-Terminus des gp30-BLV-Hüllproteins nachfolgende und Nicht-Hüllprotein kodierende Sequenz durch Bal31-Exonuklease-Behandlung, ausgehend von einem Restriktionsort nach dem C-Terminus, entfernt wird.
17. Verfahren nach den Punkten 1 und 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß die dem C-Terminus des BLV-Hüllproteins nachfolgende Nukleotidsequenz durch Bal31-Exonuklease-Behandlung, ausgehend vom PvuII-Ort, der 0,33kB nach dem C-Terminus des gp30-Hüllproteins liegt, oder von einem dem PvuII-Ort eng benachbarten Restriktionsort aus dem Multiklonierungsort des pLac-Expressionsvektors pUC19, entfernt wird.
18. Verfahren nach den Punkten 1, 5 bis 8 und 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein BglII-1,2kB-Restriktionsfragment verwendet wird, wobei der eine BglII-Ort 0,26kB vom N-Terminus des BLV-Hüllproteins entfernt liegt und der andere BglII-Ort sich 50-60 Nukleotide vor dem C-Terminus des gp30-Hüllproteins befindet.
19. Verfahren nach Punkten 1, 5 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein SmaI-BglII-0,6kB-Restriktionsfragment verwendet wird, wobei der SmaI-Ort sich 12 Nukleotide vor dem C-Terminus des gp51-Hüllproteins und damit 12 Nukleotide vor dem N-Terminus des gp30-Hüllproteins befindet und der BglII-Ort 50-60 Nukleotide vor dem C-Terminus des gp30-Hüllproteins liegt.
20. Verfahren nach Punkten 1, 4 bis 19, **dadurch gekennzeichnet**, daß als kodierende BLV-Hüllprotein-Nukleotidsequenzen eingesetzt werden, die zur Nukleotidsequenz nach Punkten 5 und 6 oder Teilen davon durch Mutation, einschließlich einfacher und mehrfacher Basensubstitution, Deletion, Insertion oder Inversion verwandt sind.
21. Verfahren nach Punkten 1, 4 bis 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß die kodierenden BLV-Nukleotidsequenzen mindestens mit einem Replikationsursprung und einer Expressionskontrollereinheit zu einem rekombinanten Plasmid verbunden werden.
22. Verfahren nach Punkten 1, 4 bis 6, 11 bis 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß die kodierende BLV-Hüllprotein-Nukleotidsequenz mit einer Expressionskontrollereinheit verbunden wird, wobei das rekombinante Plasmid nach Transformation in einen Wirt die BLV-Hüllproteinsynthese (Expression) bewirkt.

23. Verfahren nach Punkten 1, 4 bis 6, 11 bis 22, **dadurch gekennzeichnet**, daß die kodierende BLV-Hüllprotein-Nukleotidsequenz mit einer Expressionskontrolleinheit so verbunden wird, daß eine Kodierung für ein fusioniertes Protein, bestehend aus einem Teil eines Plasmid-kodierten Proteins und einem Teil eines BLV-kodierten Proteins, resultiert und daß das rekombinante Plasmid nach Transformation in einen Wirt die Proteinsynthese (Expression) eines fusionierten BLV-Hüllproteins bewirkt.
24. Verfahren nach den Punkten 1 und 20 bis 23, **dadurch gekennzeichnet**, daß als kodierende BLV-Nukleotidsequenz Teilabschnitte der BLV-Hüllprotein kodierenden Nukleotidsequenz eingesetzt werden.
25. Verfahren nach den Punkten 1, 4 bis 6 und 11 bis 24, **dadurch gekennzeichnet**, daß Teilabschnitte der BLV-Hüllprotein kodierenden Nukleotidsequenz nach den Punkten 5, 6 und 20 eingesetzt werden, die mit anderen Protein-kodierenden Sequenzen im gleichen Leserahmen der Translation verbunden sind.
26. Verfahren nach den Punkten 1, 4 bis 6, 11 bis 21 und 24 bis 25, **dadurch gekennzeichnet**, daß Teilabschnitte der BLV-Hüllprotein-kodierenden Nukleotidsequenz mit einer Expressionskontrolleinheit verbunden werden, wobei das rekombinante Plasmid nach Transformation in einen Wirt die Proteinsynthese (Expression) eines partiellen BLV-Hüllproteins bewirkt.
27. Verfahren nach Punkten 1, 4 bis 6, 11 bis 21 und 24 bis 26, **dadurch gekennzeichnet**, daß Teilabschnitte der BLV-Hüllprotein kodierenden Nukleotidsequenz mit einer Expressionskontrolleinheit so verbunden werden, daß eine Kodierung für ein fusioniertes Protein, bestehend aus einem Teil eines Plasmid-kodierten Proteins und einem Teil eines BLV-kodierten Proteins, resultiert und daß das rekombinante Plasmid nach Transformation in einen Wirt die Proteinsynthese (Expression) eines fusionierten partiellen BLV-Hüllproteins bewirkt.
28. Verfahren nach Punkten 1, 4 bis 6, 11 bis 21 und 24 bis 27, **dadurch gekennzeichnet**, daß verschiedene Teilabschnitte der BLV-Hüllprotein kodierenden Nukleotidsequenz nach Punkten 5, 6 und 20 kombiniert bzw. mehrfach verwendet werden.
29. Verfahren nach Punkten 1, 4 bis 6, 11 bis 21 und 24 bis 28, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein bestimmten Teilabschnitt der BLV-Hüllprotein kodierenden Sequenz nach Punkten 5, 6 und 20 mehrfach verwendet wird.
30. Verfahren nach den Punkten 1, 3 bis 6 und 11 bis 29, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Expressionskontrolleinheit bzw. als Teil der Expressionskontrolleinheit starke Promotoren aus Bakterien eingesetzt werden.
31. Verfahren nach den Punkten 1 und 30, **dadurch gekennzeichnet**, daß als starke Promotoren die frühen Promotoren des Phagen 17, der P_L- oder P_R-Lambda-Phagenpromotor, der trp-, Lac- oder LacUV5-Promotor aus E. coli oder der β -Lactamase-Promotor aus pBR322 eingesetzt werden.
32. Verfahren nach den Punkten 1, 30 und 31, **dadurch gekennzeichnet**, daß als starke Promotoren sogenannte Hybridpromotoren aus den in Punkt 31 genannten Promotoren eingesetzt werden.
33. Verfahren nach Punkten 1, 3 bis 6 und 11 bis 29, **dadurch gekennzeichnet**, daß BLV-Hüllprotein- oder partielles BLV-Hüllprotein — kodierende Sequenzen verbunden werden mit Nukleotidsequenzen für Plasmid-kodierte Proteine oder für Plasmid-kodierte partielle Proteine.
34. Verfahren nach den Punkten 1 und 33, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Fusion kodierende Nukleotidsequenzen für Teile der β -Galaktosidase, β -Laktamase, Chloramphenicol-Acetyltransferase oder der Neomycin- bzw. Kanamycin-Phosphotransferase eingesetzt werden.
35. Verfahren nach den Punkten 1, 33 und 34, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Fusion kodierende Nukleotidsequenzen für Teile mehrerer, im Punkt 34 genannter Plasmid-kodierter Proteine eingesetzt werden.
36. Verfahren nach den Punkten 1, 3, 30 bis 35, **dadurch gekennzeichnet**, daß zum Aufbau des rekombinanten Plasmids der HindIII-HindII-geöffnete Kanamycinresistenz-Expressionsvektor pKM967 (ZIMET-Nr. 11 060) verwendet wird, der ein pUC9-Derivat ist, bestehend aus dem SmaI-EcoRI-geöffneten pUC9-Plasmid, der Kodierung für die Kanamycin-Phosphotransferase ab 19. Aminosäure einschließlich 3'-nichtkodierender Sequenzen bis zum SmaI-Ort des Ausgangsplasmids pSV2Neo sowie bestehend aus dem SmaI-EcoRI-Rest-Multiklonierungsort des Plasmids pUC19.
37. Verfahren nach den Punkten 1, 3, 4 bis 6, 9 bis 11, 13, 20 bis 30, 33, 34 bis 36, **dadurch gekennzeichnet**, daß der HindIII-HindII-geöffnete Vektor pKM967 mittels Homopolymerentechnik mit dem BamHI-SmaI-0,48kB-BLV-Restriktionsfragment nach Punkt 13 verbunden wird, wodurch der BLV-Hüllprotein-Expressionsvektor pKDM10 (ZIMET-Nr. 11 059) entsteht.
38. Verfahren nach den Punkten 1, 3, 5, 6, 11, 20, 21 und 37, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein bakterieller Wert mit dem rekombinanten Plasmid pKDM10 transformiert, isoliert und gezüchtet wird.
39. Verfahren nach den Punkten 1, 3, 5, 6, 11, 20, 21, 37 und 38, **dadurch gekennzeichnet**, daß aus der bakteriellen Kultur ein fusioniertes partielles BLV-Hüllprotein gp51 gewonnen wird.
40. Verfahren nach den Punkten 1 und 37 bis 39, **dadurch gekennzeichnet**, daß Derivate des pKDM10-rekombinanten Plasmids eingesetzt werden.
41. Verfahren nach den Punkten 1, 3 bis 6, 8, 9 bis 11, 20 bis 30, 33 bis 38, **dadurch gekennzeichnet**, daß das 1,4kB-BclI-KpnI-Restriktionsfragment aus pKDM10 mit dem 4,0kB-BclI-KpnI-Restriktionsfragment aus penv26 verbunden wird, wobei das Kanamycin-empfindliche rekombinante Plasmid penv1026 (ZIMET-Nr. 11 063) entsteht, welches sich aus dem pUC19-Plasmid bis zum HindIII-Ort, dem 1,2kB HindIII-BclI-Fragment als Teil des 2,6kB HindIII-PvuII-BLV-Restriktionsfragments, dem 1,4kB-BclI-KpnI-Restriktionsfragment als Teil des pKDM10-Plasmids und aus dem am KpnI-Ort wieder beginnenden pUC19-Plasmid zusammensetzt.
42. Verfahren nach den Punkten 1, 3, 4 bis 8, 11, 13, 15, 20 bis 30, 33 bis 38 und 41, **dadurch gekennzeichnet**, daß die dem N-Terminus des BLV-Hüllproteins vorausgehende und Nicht-Hüllprotein-kodierende Sequenz des rekombinanten Plasmids penv1026 durch Bal31-Exonuklease-Behandlung, ausgehend von einem Restriktionsort vor dem N-Terminus, entfernt wird.
43. Verfahren nach den Punkten 1 und 42, **dadurch gekennzeichnet**, daß die dem N-Terminus des BLV-Hüllproteins vorausgehende Nukleotidsequenz durch Bal31-Exonuklease-Behandlung, bevorzugt ausgehend vom XhoI-Ort des rekombinanten Plasmids penv1026 entfernt wird.
44. Verfahren nach den Punkten 1 und 43, **dadurch gekennzeichnet**, daß das rekombinante Plasmid penv1026 am XhoI-Ort geöffnet, mit Bal31-Exonuklease behandelt, mit Ligase wieder geschlossen, in einen bakteriellen Wirt transformiert und auf Kanamycinresistenz selektiert wird, wobei BLV-Expressionsplasmide der Serie pKDM25-n oder der Serie pKDM-20-n entstehen.

45. Verfahren nach den Punkten 1, 3, 5, 6, 11, 20, 21 und 44, **dadurch gekennzeichnet**, daß das rekombinante Plasmid penv1026 am XhoI-Ort geöffnet, mit Bal31-Exonuklease behandelt, mit Ligase wieder geschlossen, in einen bakteriellen Wirt transformiert und auf Kanamycinresistenz selektiert wird, wobei das BLV-Expressionsplasmid pKDM25-101 (ZIMET-Nr. 11058) in dem der Abstand des HindIII-BglIII-Abschnittes von 0,96 kB auf 0,22 kB verringert wurde.
46. Verfahren nach den Punkten 1, 3, 5, 6, 11, 20, 21, 44 und 45, **dadurch gekennzeichnet**, daß Derivate des rekombinanten Plasmids pKDM25-101 eingesetzt werden.
47. Verfahren nach den Punkten 1, 3, 5, 6, 11, 20, 21, 23, 44 bis 46, **dadurch gekennzeichnet**, daß aus der mit pKDM25-n, bevorzugt mit pKDM25-101, transformierten bakteriellen Kultur ein fusioniertes BLV-Hüllprotein gp51 gewonnen wird.
48. Verfahren nach den Punkten 1, 3, 4 bis 6, 7, 8, 11, 13, 14, 15, 20, 21 bis 27, 30 bis 35, 37, 41, 42, 43, **dadurch gekennzeichnet**, daß das rekombinante Plasmid penv1026 am XhoI-Ort geöffnet, mit Bal31-Exonuklease behandelt, mit SacI-Restriktionsendonuklease nachgespalten, anschließend nach präparativer Gelelektrophorese sein 1,8kB-Restriktionsfragment, das die Kodierung für das gp51-Hüllprotein und für die Phosphotransferase trägt, isoliert und mit dem Sing-I SacI-geöffneten pUC19-Plasmid durch Ligase-Behandlung verbunden wird, wodurch nach Transformation eines bakteriellen Wirtes und Selektion auf Kanamycin-Resistenz die BLV-Expressionsplasmide der Serie pKDM18-n entstehen.
49. Verfahren nach den Punkten 1, 3, 5 bis 8, 11, 13 bis 15, 20 bis 27, 30 bis 35, 37, 41 bis 43 und 48, **dadurch gekennzeichnet**, daß das rekombinante Plasmid penv1026 am XhoI-Ort geöffnet, mit Bal31-Exonuklease behandelt, mit SacI-Restriktionsendonuklease nachgespalten, anschließend nach präparativer Gelelektrophorese sein 1,8kB-Restriktionsfragment, das die Kodierung für das gp51-Hüllprotein und für die Phosphotransferase trägt, isoliert und mit dem SacI-geöffneten pUC19-Plasmid durch Ligase-Behandlung verbunden wird, wodurch nach Transformation eines bakteriellen Wirtes und Selektion auf Kanamycin-Resistenz das rekombinante Plasmid pKDM18-16 (ZIMET-Nr. 11069) entsteht, in dem die BLV-gp51-Kodierung 0,1 kB nach den N-Terminus bzw. 0,16kB vor dem BglIII-Ort der gp51-Nukleotidsequenz beginnt.
50. Verfahren nach den Punkten 1, 3, 5, 6, 11, 20, 21, 48 und 49, **dadurch gekennzeichnet**, daß Derivate des rekombinanten Plasmids pKDM18-16 eingesetzt werden.
51. Verfahren nach den Punkten 1, 3, 5, 6, 11, 20, 21, 23, 48 bis 50, **dadurch gekennzeichnet**, daß aus der mit pKDM18-n, bevorzugt mit pKDM18-16, transformierten bakteriellen Kultur ein fusioniertes BLV-Hüllprotein gp51 gewonnen wird.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines BLV-kodierten Hüllproteins oder von dessen Derivaten in einem transformierten Wirt, bevorzugt E.coli. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die mikrobiologische Industrie, die Veterinärmedizin und die Tierproduktion. Die Anwendung der Erfindung betrifft die Diagnostik, Prophylaxe und Therapie der enzootischen Rinderleukose.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die enzootische Rinderleukose ist die ökonomisch bedeutendste Tumorerkrankung der Rinder. Sie wird durch das Bovine Leukämie-Virus horizontal übertragen. Der Erreger ist ein umhülltes RNA-Tumovirus, das in Zellkultur (fötale Lammnierenzellen) propagiert werden kann.

In allen europäischen Ländern wurden umfangreiche diagnostische Maßnahmen eingeleitet, um auf dem Boden einer sicheren und einfachen serologischen Diagnostik unter Einsatz des viralen Hauptoberflächenproteins(gp51) der Virushülle als Antigen Sanierungsprogramme der verseuchten Tierbestände durch Merzung oder Separierung der infizierten Tiere durchzuführen. Eine Vakzine steht international nicht zur Verfügung. Der Preis für eine Virusvakzine auf Zellkulturbasis ist so hoch, daß dieser Weg ökonomisch nicht in Frage kommt. Hinzu kommt, daß eine BLV-Vakzine wegen der Gefährlichkeit des Virus sicher inaktiviert werden muß.

Das Oberflächenantigen gp51 wird vom env-Gen (Hüllprotein-Gen) des viralen Genoms kodiert und entsteht in natürlicher Umgebung durch proteolytische Spaltung und Glykosylierung einer Vorstufe des Hüllproteins (gp51-gp30).

Es sind Verfahren zur immunologischen Diagnostik von Viruserkrankungen landwirtschaftlicher Nutztiere bekannt, die auf der Verwendung von Viruspräparaten, die aus infizierten bzw. virusinfizierten Zellkulturen gewonnen werden, beruhen. Mangel der bekannten Verfahren ist ihr hoher Arbeitsaufwand, wodurch die Notwendigkeit des Erhaltens billiger Präparate von Virus-Oberflächenantigenen entstand, die frei von Verunreinigungen durch andere tierische Eiweiße sind.

Der Einsatz der Gentechnik erlaubt die Lösung der gekennzeichneten Probleme der Diagnostik, der Prophylaxe und Therapie durch die biotechnologische Herstellung von BLV-Hüllprotein oder BLV-Hüllprotein Derivaten. Die molekulare Klonierung von BLV-Nukleotidsequenzen wurde erstmalig von LIEBSCHER et al. (WP C12N 153853 [1980] anhand von cDNA- und nicht integrierter linearer BLV-DNA beschrieben. KASHMIRI et al. (J. Virol. 49, 583 [1984] gelang die Klonierung von zirkulärer, nichtintegrierter BLV-DNA. Der resultierende BLV-DNA-Klon enthielt die komplette und unveränderte BLV-Sequenz.

NYAKATURA et al. (WP C12N 2704634) klonierten erstmalig integrierte BLV-Provirussequenzen einschließlich angrenzende zelluläre Regulationssequenzen aus Normalgewebe. Der resultierende BLV-Rekombinanten-Klon HU 1 (ZIMET-Nr. 11085) enthält auch die BLV-Nukleotidsequenzen für das env-Hüllprotein. Aus diesem Grund ist er als Ausgangsmaterial für die Gewinnung der Hüllprotein-kodierten-Sequenz besonders geeignet. Aber auch ein chemisch-synthetisiertes BLV-env-Gen wäre verwendbar.

Das Problem der Diagnostik, Prophylaxe und Therapie der enzootischen Rinderleukose kann mit Hilfe gentechnischer Methoden auf prinzipiell neuem Weg gelöst werden. Durch Kopplung der kodierten BLV-env-Sequenz an eine Expressionskontrollereinheit sowie ihrer Einfügung in replikationsfähige DNA-Vektoren, z.B. Plasmide, ist es möglich, BLV-Hüllprotein in Mikroorganismen biosynthetisch herzustellen. Biosynthetisches BLV-Hüllprotein oder Hüllproteinderivate sind als antigene Substanz vielfältig für die Diagnostik, Prophylaxe und Therapie der enzootischen Rinderleukose und verwandter Viruserkrankungen einsetzbar. Ein Präparat eines mikrobiell hergestellten BLV-Hüllproteins kann als diagnostische Probe oder als ungefährliche BLV-Vakzine verwendet werden.

International liegt bisher kein Beispiel der Expression von BLV-Hüllprotein in rekombinanten Mikroorganismen oder mit Rekombinanten-DNA-transfizierten tierischen Zellen vor. Es gibt lediglich Beispiele für die Expression von Hüllproteinen anderer RNA-Tumoviren in Mikroorganismen.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, ein gentechnisches Verfahren zur Herstellung von BLV-kodierten Hüllprotein oder dessen Derivaten in einem Wirt bereitzustellen, wobei das gewinnbare BLV-Hüllprotein für die Diagnostik, Prophylaxe und/oder Therapie der enzootischen Rinderleukose einsetzbar ist.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur biosynthetischen Herstellung von BLV-kodierten Hüllprotein oder dessen Derivaten in einem transformierten Wirt zu entwickeln. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) einen solchen Wirt mit einem rekombinanten Plasmid, das mindestens aus einem Replikationsursprung, einer Expressionskontrollereinheit und einer für ein Hüllprotein oder Teilen davon kodierten BLV-Nukleotidsequenz besteht, transformiert.
- b) diesen Wirt isoliert und unter Bildung einer großen Population des Wirts züchtet und
- c) das BLV-kodierte Hüllprotein oder dessen Derivate aus der Kultur gewinnt.

Das erfindungsgemäße Verfahren verwendet bevorzugt Mikroorganismen als Wirt, insbesondere *E. coli*.

Die für das BLV-Protein kodierenden Sequenzen stammen aus natürlichen, synthetischen oder halbsynthetischen Nukleotidsequenzen. Eine bevorzugt eingesetzte Sequenz ist eine Nukleotidsequenz aus dem BLV-Rekombinantenklon HU-1 (ZIMET-Nr. 11085) (WP C12N 270 4634), die für ein BLV-Hüllprotein oder ein BLV-Hüllproteinderivat kodiert. Bevorzugterweise wird diese BLV-Nukleotidsequenz aus Plasmid-BLV-Rekombinanten-Klonen, die die Restriktionsfragmente des BLV-Rekombinanten-Klons HU1 enthalten, gewonnen.

Insbesondere wird als Restriktionsfragment das 2,6kB-HindIII-PvuII-Fragment eingesetzt, welches die für ein BLV-Hüllprotein kodierende Nukleotidsequenz vollständig enthält. Der N-Terminus befindet sich 0,7kB vom HindIII-Ort entfernt, der C-Terminus des gp51-Anteils des Hüllproteins 1,6kB vom HindIII-Ort entfernt und der C-Terminus des gp30-Anteils des Hüllproteins 2,25kB vom HindIII-Ort des Restriktionsfragmentes entfernt.

Diese Daten ergeben sich aus den Sequenzdaten, die zur Nukleotidsequenz des BLV-Rekombinantenklons HU 1 (ZIMET-Nr. 11085) vorliegen (WP C12N 270 4634) und aus dem Vergleich eigener Restriktionsdaten mit publizierten Restriktionsdaten zu einem BLV-env-Gen aus Tumorgewebe (RICE et al.: *Virology* **138**, 82 [1984], mit Restriktionsdaten von KASHMIRI et al. (*J. Virol.* **49**, 583 [1984] und mit den Restriktionsdaten zum BLV-HU 1-Klon (ZIMET-Nr. 11085) (WP C12N 270 4634), s. Abb. 1.

Das HindIII-PvuII-2,6kB-BLV-Restriktionsfragment wird mit dem HindIII-SmaI-geöffneten plac-Expressionsvektor pUC19 verbunden, wobei das Rekombinantenplasmid penv26 (ZIMET-Nr. 11062) entsteht.

Ein anderes Restriktionsfragment, das 2,0kB-BamHI-Restriktionsfragment aus dem Rekombinantenklon HU 1, enthält einen Teil des Hüllproteins-Gens, wobei die Kodierung an dem einen BamHI-Ort 406 Nukleotide nach dem N-Terminus des env-Gens beginnt und über den C-Terminus hinaus weitere BLV-Nukleotid-Sequenzen 3'-terminal enthält. Dieses 2,0kB-BamHI-Restriktionsfragment wird mit dem BamHI-geöffneten plac-Expressionsvektor pUC13 durch T4-Ligasebehandlung verbunden, wobei das Rekombinantenplasmid penv53 entsteht (ZIMET-Nr. 11061).

Natürlich ist es auch möglich, Restriktionsfragmente zu verwenden, die nur Teile des BLV-Hüllprotein-Gens bzw. der BLV-Hüllprotein-kodierenden-Sequenz ohne zusätzliche andere BLV-Nukleotidsequenzen enthalten. Ein solches Fragment ist das BglII-SmaI-0,63kB-Restriktionsfragment, wobei der BglII-Ort 0,26kB vom N-Terminus des Hüllproteins entfernt liegt und der SmaI-Ort sich 12 Nukleotide vor dem C-Terminus des gp51-Anteils des BLV-Hüllproteins befindet. Ein weiteres Fragment dieser Art ist das BamHI-SmaI-0,48kB-Restriktionsfragment, wobei der BamHI-Restriktionsort 0,4kB vom N-Terminus des Hüllproteins entfernt liegt und der SmaI-Ort sich 12 Nukleotide vor dem C-Terminus des gp51-BLV-Hüllprotein-Anteils befindet.

Wenn Fragmente zum Einsatz kommen, die Nicht-Hüllprotein-kodierende-Sequenzen zusätzlich zur BLV-Hüllprotein-kodierenden-Sequenz enthalten, ist es möglich, durch Bal31-Exonuklease-Behandlung die Nicht-Hüllprotein-kodierenden-Sequenzen, ausgehend von Restriktionsorten außerhalb des Hüllprotein-Gens (env), zu entfernen. Zur Entfernung der Nicht-Hüllprotein-kodierenden-Sequenz vor dem N-Terminus des Hüllprotein-Gens eignet sich der HindIII-Ort oder bevorzugt der XhoI-Ort, der sich 0,26kB vor dem N-Terminus befindet und z. B. im Plasmid penv26 vorkommt.

Zur Entfernung der Nicht-Hüllprotein-kodierenden-Sequenz nach dem C-Terminus des Hüllprotein-Gens bzw. nach dem C-Terminus des gp30-Anteils eignet sich der pvuII-Ort, der sich 0,33kB nach dem C-Terminus befindet, bzw. nach Klonierung auch ein unmittelbar benachbarter Restriktionsort, z. B. aus dem Multiklonierungsort des plac-Expressionsvektors pUC19 wie im Fall des Plasmids penv26.

Weitere Restriktionsfragmente, die sich für die Herstellung von BLV-Hüllprotein bzw. BLV-Hüllprotein-Derivaten eignen, sind das BglII-1,2kB-Restriktionsfragment aus penv26 und das SmaI-BglII-0,6kB-Restriktionsfragment aus penv26, wobei im ersten Fall ein BglII-Ort 0,26kB vom N-Terminus des BLV-Hüllproteins entfernt liegt und der andere BglII-Ort sich 50-60 Nukleotide vor dem C-Terminus des gp30-Hüllproteins befindet. Im zweiten Fall befindet sich der SmaI-Ort 12 Nukleotide vor dem C-Terminus des gp51-Hüllproteinanteils bzw. 12 Nukleotide vor dem N-Terminus des gp30-Hüllproteinanteils und der BglII-Ort 50-60 Nukleotide vor dem C-Terminus des gp30-Hüllproteins.

Ebenso wie die genannten kodierenden BLV-Hüllprotein-Nukleotidsequenzen können Nukleotidsequenzen verwendet werden, die zu den genannten Sequenzen durch Mutation, einschließlich einfacher und mehrfacher Basensubstitution, Deletion, Insertion oder Inversion verwandt sind.

Die genannten Nukleotidsequenzen werden mindestens mit einem Replikationsursprung und einer Expressionskontrollereinheit zu einem Rekombinantenplasmid verbunden, um zu erreichen, daß BLV-Hüllprotein bzw. BLV-Hüllprotein-Derivate in einem

transformierten Wirt hergestellt bzw. synthetisiert werden. Dabei werden in einer bevorzugten Ausführungsform die kodierenden BLV-Hüllprotein-Nukleotidsequenzen mit einer Expressionskontrolleinheit so verbunden, daß eine Kodierung für ein fusioniertes Protein, welches aus einem Teil eines Plasmid-kodierten-Proteins und einem Teil eines BLV-kodierten-Proteins besteht, resultiert und daß nach Transformation das rekombinante Plasmid die Proteinsynthese (Expression) eines fusionierten BLV-Hüllproteins in einem Wirt bewirkt. Zur Fusionierung werden bevorzugt Teilabschnitte der BLV-Hüllprotein-kodierenden-Nukleotidsequenz eingesetzt. Dabei wird so verfahren, daß diese Sequenzen mit anderen Protein-kodierenden-Sequenzen im gleichen Leserahmen der Translation verbunden sind.

Teilabschnitte der BLV-Hüllprotein-kodierenden-Nukleotidsequenz können natürlich auch direkt mit einer Expressionskontrolleinheit verbunden werden, so daß das rekombinante Plasmid nach Transformation in einen Wirt die Proteinsynthese (Expression) eines partiellen BLV-Hüllproteins bewirkt.

Außerdem ist es möglich, verschiedene Teilabschnitte der BLV-Hüllprotein-kodierenden Nukleotidsequenz zu kombinieren bzw. mehrfach zu verwenden oder einen bestimmten Teilabschnitt mehrfach zu benutzen.

Als Expressionskontrolleinheit bzw. als Teil der Expressionskontrolleinheit werden bevorzugt starke Promotoren eingesetzt, insbesondere die frühen Promotoren des Phagen T7, der P_L- oder P_R-Lambda-Pagenpromotor, der trp-, lac- oder lacUV5-Promotor aus E. coli aber auch der β -Laktamase-Promotor aus pBR322. Als starke Promotoren sind ebenso Hybridpromotoren aus den genannten starken Promotoren verwendbar.

Zur Fusionierung der BLV-Hüllprotein- oder partiellen BLV-Hüllprotein-kodierenden-Nukleotidsequenz werden Nukleotidsequenzen für Plasmid-kodierte-Proteine oder für Plasmid-kodierte partielle Proteine verwendet. Das sind Nukleotidsequenzen für Teile der β -Galaktosidase, β -Laktamase, Chloramphenikol-Acetyltransferase oder der Neomycin- bzw. Kanamycin-Phosphotransferase.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Kanamycin-Phosphotransferase zur Fusion verwendet. Hierzu wird ein speziell konstruierter Kanamycin-Resistenz-Expressionsvektor pKM967 (ZIMET-Nr. 11060) verwendet. Dieser Vektor besteht aus dem SmaI-EcoRI-geöffneten pUC9-Plasmid (VIEIRA, J., und MESSING, J. Gene **19**, 259 [1982]), der Kodierung für Kanamycin-Phosphotransferase ab 19. Aminosäure einschließlich nichtkodierender 3'-terminaler Sequenzen zum SmaI-Ort des Ausgangsplasmids pSV2Neo (SOUTHERN, P. J., and P. BERG, J. Mol. Appl. Genet. **1**, 327 [1982]), sowie aus dem SmaI-EcoRI-Rest-Multiklonierungsort des Plasmids pUC19 (YANISCH-PERRON, C. et al., Gene **33**, 103-119 [1985]). Dieser Vektor exprimiert die Kanamycin-Phosphotransferase unter dem plac-Promotor und vermittelt die Kanamycin-Resistenz.

Anschließend wird der HindIII-HindIII-geöffnete Expressionsvektor pKM967 mittels Homopolymerentechnik mit dem BamHI-SmaI-0,48-kB-BLV-Restriktionsfragment verbunden, wodurch der BLV-Hüllprotein-Expressionsvektor pKDM10 (ZIMET-Nr. 11059) entsteht. Dieser Vektor wird benutzt, um einen bakteriellen Wirt, E. coli, zu transformieren. Aus der bakteriellen Kultur ist es möglich, ein fusioniertes, partielles BLV-Hüllprotein aus dem gp51-Anteil zu isolieren.

In einer Weiterführung dieser Variante werden Derivate des pKDM10-Expressionsvektors verwendet. So wird das 1,4-kB-BclI-KpnI-Restriktionsfragment aus pKDM10 mit dem 4,0-kB-BclI-KpnI-Restriktionsfragment aus penv26 verbunden, wobei das rekombinante Plasmid penv1026 (ZIMET-Nr. 11063) entsteht. Dieses setzt sich aus Sequenzen des pUC19-Plasmids bis zum HindIII-Ort, dem 1,2-kB-HindIII-BclI Fragment als Teil des 2,6-kB-HindIII-PvuII-BLV-Restriktionsfragmentes, dem 1,4-kB-BclI-KpnI-Restriktionsfragment als Teil des pKDM10-Plasmids und aus dem am KpnI-Ort wieder beginnenden pUC19-Plasmid zusammen. Das Plasmid penv1026 exprimiert die Phosphotransferase nicht und vermittelt damit keine Kanamycinresistenz. Ursache hierfür sind die dem N-Terminus des BLV-Hüllproteins vorausgehenden Nicht-Hüllprotein-kodierenden-Sequenzen, die durch Bal31-Exonukleasebehandlung entfernt werden müssen, um zu einem Expressionsvektor zu gelangen. Ausgangspunkt hierfür ist ein Restriktionsort vor dem N-Terminus. Bevorzugt wird von dem XhoI-Ort des rekombinanten Plasmids penv1026 ausgegangen. XhoI-geöffnetes Plasmid penv26 wird mit Bal31-Exonuklease behandelt, danach mit Ligase wieder geschlossen (ligiert), in einen bakteriellen Wirt transformiert und auf Kanamycinresistenz selektiert. Es entstehen daraus verschiedene Serien von Expressionsplasmiden, z. B. pKDM25-n oder pKDM20-n, die sich durch unterschiedliche Deletionen im Bereich zwischen HindIII-Ort und BLV-Hüllprotein-kodierender-Sequenz des Ausgangsplasmides penv1026 auszeichnen. Ein Vertreter ist das Plasmid pKDM25-101 (ZIMET-Nr. 11058), in dem der Abstand des HindIII-BglII-Abschnittes von 0,96 kB auf 0,22 kB verringert wurde. Dieses Plasmid und Derivate dieses Plasmids werden benutzt zur Transformation von bakteriellen Wirten, aus denen ein fusioniertes BLV-Hüllprotein-gp51-Derivat gewonnen wird.

In einer Variante hierzu wird das XhoI-geöffnete penv1026-Plasmid erneut mit Bal31-Exonuklease behandelt, danach aber mit SacI-Restriktionsendonuklease nachgespalten, anschließend nach präparativer Gelelektrophorese ein etwa 1,80-kB-Restriktionsfragment, das die Kodierung für das gp51-Hüllprotein und für die Phosphotransferase trägt, isoliert und mit dem SmaI-SacI-geöffneten pUC19-Plasmid ligiert. Nach Transformation eines bakteriellen Wirtes und Selektion auf Kanamycin-Resistenz entstehen BLV-Expressionsplasmide der Serie pKDM18-n. Ein ausgewählter Vertreter ist das rekombinante Plasmid pKDM18-16 (ZIMET-Nr. 11069), in dem die BLV-gp51-Kodierung 0,1 kB nach dem N-Terminus bzw. 0,16 kB vor dem BglII-Ort der gp51-Nukleotidsequenz beginnt. Die Übergangsnukleotidsequenz ist in Bsp. 7 angegeben. Dieses Plasmid oder Derivate davon werden benutzt zur Transformation bakterieller Wirte, bevorzugt E. coli, wobei nach Kultivierung ein fusioniertes BLV-Hüllprotein gp51 gewonnen wird.

Gegenstand der Erfindung sind neben den Verfahren zur Herstellung eines BLV-kodierten-Hüllproteins oder dessen Derivaten in einem transformierten Wirt auch die o. g. Vektoren bzw. Expressionsvektoren bzw. Rekombinantenplasmide, insbesondere:

penv26 (ZIMET-Nr. 11062)
penv53 (ZIMET-Nr. 11061)
pKDM10 (ZIMET-Nr. 11059)
penv1026 (ZIMET-Nr. 11063)
pKDM 25-101 (ZIMET-Nr. 11058)
pKDM 18-16 (ZIMET-Nr. 11069)
pKDM 967 (ZIMET-Nr. 11060)

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls BLV-Hüllprotein oder Teile davon oder Derivate davon, die mit den dargelegten Verfahren unter der Benutzung der beschriebenen rekombinanten Plasmide hergestellt werden.

Beispiel 1**Konstruktion des Kanamycinresistenz-Expressionsvektors pKM967**

Die DNA des Plasmides pSV2neo (SOUTHERN, P. J., und P. BERG: J. Mol. Appl. Genet. **1**, 327 [1982]) wurde mit BglII- und SmaI-Endonuklease gespalten. Auf dem 1,05kB-Fragment befindet sich das vollständige Strukturgen für die Aminoglycosid-Phosphotransferase II, welches dem Kanamycin-Resistenzgen von Tn5 (BECK et al. Gene **19**, 327 [1982]) entspricht. Das 1,05kB-Fragment wurde in den BamHI-SmaI-geöffneten Vektor pUC19 kloniert, wobei der Vektor pKM193 entstand. Dieser Vektor wurde anschließend mit HindIII-Endonuklease gespalten, mit Bal31-Exonuklease behandelt und danach mit EcoRI-Endonuklease nachgespalten und schließlich in den SmaI-EcoRI-geöffneten Vektor pUC9 kloniert. Unter mehreren Klonen, die Kanamycinresistenz aufwiesen, befand sich der Klon pKM967. Die von diesem Klon vermittelte Resistenz betrug 120 µg/ml, etwas geringer als im Fall des Ausgangsklons. Diese Kanamycinresistenz steht unter Kontrolle des plac-Promotors des pUC19-Plasmids. Die Bal31-Exonukleasebehandlung resultierte in einer Verkürzung des Strukturgens um 17 Aminosäuren der Phosphotransferase im Fall des ausgewählten Klons pKM967. Die Sequenz im Übergangsbereich wurde bestimmt:

<u>CGGATCCC</u>	AGGCTA
Bam HI	52.Bp.d.Phosphotransferase
pUC9	

Beispiel 2**Konstruktion des Expressionsvektors pKDM10**

Die DNA des Plasmids pKM967 wurde mit HindIII- und HindII-Endonuklease gespalten und mittels Homopolymeren-Technik (DDR-Patentschrift 143794) mit dGTP verlängert. Das 0,48kB-BLV-Restriktionsfragment aus dem Plasmid penv53 (s. Beispiel 4) wurde mit dCTP verlängert. Nach Hybridisation der Enden und Klonierung wurden mehr als 200 Klone isoliert. In einem Verhältnis von etwa 1:18 waren diese Klone resistent gegenüber Kanamycin. Dies entspricht der Erwartung, da mit dieser Klonierungstechnik für das 0,48kB-BLV-Restriktionsfragment (BamHI-SmaI) zwei Orientierungsmöglichkeiten und jeweils drei verschiedene Leserahmen resultieren. Ein Klon, pKDM10, wurde ausgewählt. Dieser Klon exprimiert ein Fusionsprotein, welches N-terminal wenige Aminosäuren der β -Galaktosidase des pUC-Vektors, danach Teilsequenzen des gp51-Anteils des Hüllproteins von BLV sowie C-terminal die Sequenzen der Phosphotransferase enthält.

Beispiel 3**Konstruktion des Vektors penv26**

Das 2,6kB HindIII-PvuII-Restriktionsfragment des BLV-Rekombinanten-Klons HU1 (ZIMET-Nr. 11085) WP C12N 2704634) wurde durch präparative Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und in den HindIII-SmaI-geöffneten plac-Expressionsvektor pUC19 verbunden. Dieser Klon enthält die gesamte Nukleotidsequenz für das Hüllprotein sowie 5'- und 3'-BLV-Sequenzen, die das env-Gen umschließen. Durch Restriktionsanalyse mit den Enzymen BglII, BamHI, SmaI, XhoI wurde die Identität des BLV-Segments bewiesen.

Beispiel 4**Konstruktion des Vektors penv53**

Das 2,0kB BamHI-Restriktionsfragment des BLV-Rekombinanten-Klons HU1 (ZIMET-Nr. 11085) (WP C12N 2704634) wurde durch präparative Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und in den BamHI-geöffneten plac-Gelelektrophorese gereinigt und in den BamHI-geöffneten plac-Expressionsvektor pUC13 durch Ligasebehandlung eingefügt, wobei das Rekombinantenplasmid penv53 entstand. Die Identität wurde durch Restriktionsanalyse mit den Enzymen BglII, PvuI und BamHI bewiesen.

Beispiel 5**Konstruktion des Vektors penv1026**

Die DNA des Plasmids pKDM10 wurde mit den Enzymen BclI und KpnI gespalten, das 1,4kB BclI-KpnI-Restriktionsfragment mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und durch T4-Ligase-Behandlung mit dem 4,0kB-BclI-KpnI-Restriktionsfragment aus penv26 verbunden, wobei das rekombinante Plasmid penv1026 entsteht. Die Identität des Plasmids wurde durch Restriktionsanalyse mit den Enzymen XhoI, SmaI, BglII und BamHI festgestellt.

Beispiel 6**Konstruktion des Expressionsvektors pKDM25-101**

Das Plasmid penv1026 vermittelt keine Expression des Fusionsproteins aus Teilen des BLV-Hüllproteins und der Phosphotransferase. Ursache hierfür sind die dem N-Terminus des BLV-Hüllproteins vorangestellten Nukleotidsequenzen vor dem env-Gen. Aus diesem Grund wird das Plasmid penv1026 durch XhoI-Endonuklease geöffnet bzw. linearisiert, danach mit Bal31 behandelt, wobei diese Exonuklease-Behandlung so durchgeführt wurde, daß etwa 300–400 Nukleotide von jedem Ende des Vektors abgebaut wurden. Nach T4-Ligase-Behandlung bzw. Rezyklisierung sowie Transformation wurden kanamycinresistente Klone selektiert. Ein Vertreter dieser Klone ist das Plasmid pKDM25-101, in dem der Abstand des HindIII-BglII-Abschnittes von 0,96 kB im Ausgangsvektor penv1026 auf 0,22 kB verringert wurde. Das Plasmid vermittelt die Expression eines Fusionsproteins, das N-terminal aus wenigen Aminosäuren der β -Galaktosidase, gefolgt von nahezu dem vollständigen gp51-Anteil des BLV-Hüllproteins, sowie C-terminal aus der Phosphotransferase besteht.

Beispiel 7**Konstruktion des Expressionsvektors pKDM18-16**

In einer Variante z.B. 6 wurde der XhoI-geöffnete penv1026-Vektor erneut mit Bal31-Exonuklease behandelt, danach aber mit dem Enzym SacI nachgespalten, anschließend ein etwa 1,8 kB-Restriktionsfragment, das die Kodierung für das gp51-Hüllprotein und für die Phosphotransferase trägt, isoliert und mit dem SmaI-SacI-geöffneten pUC19-Plasmid durch T4-Ligasebehandlung ligiert. Nach Transformation von E. coli JM101 wurden kanamycinresistente Klone isoliert und durch Restriktionsanalyse charakterisiert. Ein ausgewählter Vertreter ist das Plasmid pKDM18-16, in dem die BLV-gp51-Kodierung etwa 0,1 kB nach dem N-Terminus bzw. 0,16 kB vor dem BglII-Ort der gp51-Nukleotidsequenz beginnt. Von diesem Klon wurde die DNA isoliert und die Übergangssequenz vom Multiklonierungsort des pUC19-Plasmids in die BLV-gp51-kodierende Region bestimmt:

GAG GAT CCC CAG CCC ATC CAG ACT TGG

BamHI

1. Aminosäure des reifen gp51-Hüllproteins

Beispiel 8**Nachweis des BLV-env-Genproduktes durch Flüssigphasen-Konkurrenz-RIA (Radioimmunassay)**

Die Isolierung und Jodierung von BLV-gp51 sowie die Durchführung des zum Expressionsnachweis verwendeten Konkurrenz-RIA erfolgte nach den von PORTETELLE et al. (Virology **105**, 223 [1980]) beschriebenen Methoden.

Bakterienlysate von E. coli-env-Rekombinanten (pKDM 10, pKDM1816, pKDM25-101) und von Kontrollen (penv1026, penv26, JM101) wurden wie folgt gewonnen:

Bakterien bzw. transformierte Bakterien wurden im Vollmedium mit 40 μ g/ml Ampizillin bis zu einer Zelldichte von 1×10^8 Bakterien/ml gezüchtet, dann mit IPTG (Isopropylthiogalaktosid) stimuliert und bei einer Zelldichte von 2×10^8 Bakterien/ml geerntet. Die Bakterien wurden konzentriert, gewaschen und durch Lysozym-EDTA-Behandlung unter Zugabe von Triton X 100 lysiert. Nach Ultrazentrifugation wurden die Lysate in einer Konzentration von 10^{10} „Bakterien“/0,5 ml Puffer aufgenommen. Die Bakterienlysate wurden in RIA-Puffer (0,25% HSA, 0,02% Triton X-100, 0,02% Natriumazid, 150 mM NaCl, 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,4) verdünnt und in einem Konzentrationsbereich, der 10^8 – 10^9 Bakterienzellen pro Testansatz entspricht, im RIA eingesetzt.

Jedem Testansatz wurden weiterhin 1,0–0,5 ng ¹²⁵Jod-markiertes gp51 (ca. 20 000 cpm) und Anti-gp51-Serum von Kaninchen in einer Verdünnung, bei der 30–50% des ¹²⁵Jod-gp51 präzipitiert werden, zugesetzt. Die Proben wurden ca. 48 Std. bei 4°C inkubiert. Zur Präzipitation der Immunkomplexe wurde den Proben anschließend 50–100 μ l Antispecies-Antiserum zugesetzt und für weitere 10–20 Std. bei 4°C inkubiert. Die Immunpräzipitate wurden mit ca. 5 ml PBS-0,2% Triton X-100 gewaschen, durch Zentrifugation bei 3500 g für 30' sedimentiert und im gamma-Strahlungsmeßgerät gemessen. Vergleich mit einem BLV-gp51-Konzentrationsstandard.

In Lysaten der env-Rekombinanten pKDM10, pKDM1816, pKDM25-101 betrug die durchschnittliche Menge des mikrobiellen env-Genproduktes 0,015–0,02 ng/ μ l Lysat. Durch IPTG-Zusatz verdoppelte sich diese Menge auf Werte zwischen 0,024–0,040 ng/ μ l. Die Kontroll-Lysate (JM 101, penv 1026, penv 26) ergaben Werte zwischen 0,002–0,007 ng/ μ l.

Abgeleitete
Restriktionskarte
aus Sequenzdaten

- Analyse eines Abschnitts des BLV-HU1-Klons
- Sequenzdaten Nyakatura et al (WP)
- Restriktionsdaten (eigene)

