(19)

SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 980561 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 980561

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
A61K 38/00
A61K 39/00
A61K 39/02
C07H 19/00
C07H 21/02
C07K 2/00
C07K 4/04
C07K 14/20
C12P 19/34
A61K 2/00 (2006.01)
A61K 4/04 (2006.01)
A61K 14/20 (2006.01)
A61K 19/00 (2006.01)
A61K 19/34 (2006.01)
A61K 21/02 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **16.09.1996**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **13.03.1998**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **13.05.1998**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **16.09.1996 PCT/US1996/014819**

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

15.09.1995 US 529055

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **UAB Research Foundation,** UAB Station Birmingham, Birmingham, AL 35294-2170, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Briles, David E.,** Birmingham, AL 23222, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **McDaniel, Larry S.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 • **Swiatlo, Edwin,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 • **Yother, Janet,** Birmingham, AL 35242, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
5 • **Crain, Marilyn J.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
6 • **Hollingshead, Susan,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
7 • **Tart, Rebecca,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
8 • **Brooks-Walter, Alexis,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Forssén & Salomaa Oy, Lautatarhankatu 8 B, 00580 Helsinki

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

Pneumokokkaalliset geenit, niiden osat, ilmentämistuotteet niistä ja s ellaisten geenien, osien ja tuotteiden käytöt

Pneumococcala gener, delar av dessa, uttrycksprodukter av dessa och an vändningar av dylika gener, delar och produkter

Pneumokokkigeenit, niiden osat, niistä ilmentyneet tuotteet sekä tällaisten geenien, osien ja tuotteiden käytöt

Pneumococcal gener, delar av dessa, uttrycksprodukter av dessa och användningar av dylika gener, delar och produkter

Asiaan liittyvät patenttihakemukset

Tämä hakemus on osittainen jatkohakemus patenttihakemuksiin, joiden sarjanumerot ovat 08 529 055, jätetty 15. syyskuuta 1995, 08/226 884, jätetty 29. toukokuuta 1992, 08/093 907, jätetty 29. toukokuuta 1992, 07/884 918, jätetty 5. heinäkuuta 1994 (vastaa julkaisua PCT/US93/05191); hakemukseen, jonka sarjanumero on 08/482 981, jätetty 7. kesäkuuta 1995; hakemukseen, jonka sarjanumero on 08/458 399, jätetty 2. kesäkuuta 1995; hakemukseen, jonka sarjanumero on 08/446 201, jätetty 19. toukokuuta 1995 (hakemuksen USSN 08/246 636 osittaisena jatkohakemuksena), hakemukseen, jonka sarjanumero on 08/246 636, jätetty 20. toukokuuta 1994 (osittaisena jatkohakemuksena hakemukseen USSN 08/048 896, joka on jätetty 20. huhtikuuta 1993 osittaisena jatkohakemuksena hakemukseen USSN 07/835 698, joka on jätetty 12. helmikuuta 1992 osittaisena jatkohakemuksena hakemukseen USSN 07/656 773); hakemukseen, jonka sarjanumero on 08/319 795, jätetty 7. lokakuuta 1994 (jatkohakemuksena hakemukseen USSN 08/246 636); hakemukseen, jonka sarjanumero on 08/072 070, jätetty 3. kesäkuuta 1993; hakemukseen, jonka sarjanumero on 07/656 773, jätetty 15. helmikuuta 1991 (hakemusten USSN 656 773 ja 835 698 vastatessa kansainvälistä hakemusta WO 92/1448); ja jokainen näistä hakemuksista sekä jokainen näissä hakemuksissa siteerattu hakemus, asiakirja tai viite sisällytetään oheen tällä viittauksella. Asiakirjoja tai viitteitä on myös siteerattu seuraavassa tekstissä, joko eräisiin esimerkkeihin liitetyssä tai ennen vaatimuksia olevassa viiteluettelossa tai itse tekstissä; ja kukin näistä asiakirjoista tai viitteistä sisällytetään erityisesti oheen tällä viittauksella.

Keksinnön ala

Tämän keksinnön kohteena ovat pneumokokkigeenit, niiden osat, niistä ilmentyneet tuotteet sekä tällaisten geenien, osien ja tuotteiden käytöt; erityisesti *Streptococcus pneumoniae* -eliön geenit, esimerkiksi pneumokokkimaista A-pintaproteiinia (PspA) koodaava geeni (joka geeni on *"pspA"*), *pspA*:n kaltaiset geenit, pneumokokkimaista C-pintaproteiinia (PspC) koodaava geeni (joka geeni on *"pspC"*), tällaisten geenien osat, niistä ilmentyneet tuotteet sekä tällaisten geenien, niiden osien tai niistä ilmentyneiden tuotteiden käytöt. Näistä käytöistä voidaan mainita geenien ja niiden osien käyttäminen ilmentymistuotteiden saamiseksi yhdistelmä-DNA-tekniikoilla sekä *Streptococcus pneumoniae* -eliön tai sen kantojen läsnäolon toteamiseksi ilmaisemalla sen tai niiden DNA hybridisaatio- tai monistus- (esim. PCR) sekä hybridisaatiotekniikalla (esimerkiksi, DNA:ta sisältävä näyte hankitaan, se saatetaan kosketukseen geenien tai kappaleen kanssa PCR-reaktion, monistuksen ja/tai hybridisaation olosuhteissa, minkä jälkeen hybridin tai monistuneen tuotteen läsnäolo ilmaistaan tai se eristetään). Ilmentyneeseen tuotteeseen liittyvistä käytöistä voidaan mainita käyttö antigeenisten tai immunologisten koostumusten tai rokotekoostumusten valmistamiseksi, vasta-aineiden, immunologisen vasteen (muu kuin nämä vasta-aineet tai vasta-aineiden lisäksi) tai suojaavan vasteen (mukaan lukien vasta-aine- tai muu immunologinen vaste antamalla koostumusta sopivalle isännälle) tuottamiseksi; tai tätä ilmentynyttä tuotetta voidaan käyttää *Streptococcus pneumoniae*:n läsnäolon toteamiseksi ilmaisemalla *Streptococcus pneumoniae* -proteiinia/proteiineja vastaan vaikuttavat vasta-aineet tai sen/niiden osia vastaan vaikuttavat vasta-aineet isännässä, esimerkiksi siten, että asiaan liittyvästä isännästä saadaan vasta-ainetta sisältävä näyte, tämä näyte saatetaan kosketukseen ilmentyneen tuotteen kanssa ja sitoutuminen ilmaistaan (esimerkiksi siten, että tuote on leimattu); ja edellä mainittujen koostumusten avulla tuotettuja vasta-aineita voidaan käyttää diagnostisissa tai ilmaisemiseen käyttökelpoisissa reagenssipakkauksissa tai määrityksissä. Näin ollen keksintö kohdistuu erilaisiin ainekoostumuksiin sekä menetelmiin niiden käyttämiseksi.

Keksinnön tausta

Streptococcus pneumoniae on välikorvatulehduksen (otitis media), aivokalvontulehduksen (meningitis), bakteeriverisyyden (bacteremia) ja keukokuumeen merkittävä aiheuttaja. Antibioottien ja rokotteiden käytöstä huolimatta pneumokokki-infektioiden esiintyminen on vähentynyt vain vähän viimeisten 25 vuoden aikana.

Yleisesti hyväksytty käsitys on se, että pneumokokin polysakkaridikapselia vastaan vaikuttavat spesifiset vasta-aineet voivat välittää immuniteettia *Streptococcus pneumoniae* -eliölle. Vastasyntyneet ja nuoret lapset eivät kykene kuitenkaan tuottamaan immuunivastetta polysakkaridiantigeeneja vastaan, vaan heissä voi esiintyä toistuvia infektioita, joihin sama kapseliserotyyppi osallistuu.

Eräs lähestymistapa pienten lasten immunoimiseksi lukuisia kapseloituneita bakteereita vastaan on konjugoida nämä kapselin polysakkaridiantigeenit proteiiniin siten, että ne saadaan immunogeenisiksi. Tämä lähestymistapa on ollut onnistunut esimerkiksi *Haemophilus influenzae b* -eliön tapauksessa (katso US patenttijulkaisu 4 496 538, nimellä Gordon, sekä US-patenttijulkaisu 4 673 574, nimellä Anderson). Olemassa on kuitenkin yli 80 tunnettua *S. pneumoniae* -kapselin serotyyppiä, joista 23 aiheuttaa suurimman osan sairauksista. Jotta pneumokokin polysakkaridista ja proteiinista muodostettu konjugaatti olisi hyödyllinen, ne kapselityypit, jotka ovat useimpien pneumokokki-infektioiden aiheuttajia, olisi saatava riittävän immunogeenisiksi. Tämä lähestymistapa saattaa olla vaikea, koska niistä 23 polysakkaridista, joita tällä hetkellä saatava rokote sisältää, kaikki eivät ole riittävän immunogeenisiä edes aikuisissa.

Vaihtoehtoisena lähestymistapana lasten ja samoin myös ikääntyneiden henkilöiden suojaamiseksi pneumokokki-infektiolta on tunnistaa ne proteiiniantigeenit, jotka saattavat tuottaa suojaavia immuunivasteita. Tällaiset proteiinit voivat toimia itsessään rokotteina tai niitä voidaan käyttää yhdessä hyödyllisten, polysakkaridin ja proteiinin välisten konjugaattien kanssa tai niitä voidaan käyttää polysakkaridien kantajina.

Julkaisussa McDaniel et al. (I), J. Exp. Med. 160:386—397, 1984, tarkastellaan hybridomavasta-aineiden valmistusta, jotka vasta-aineet tunnistavat *S. pneumoniae*:n solupinnan polypeptidin (polypeptidejä), sekä hiirten suojaamista tiettyjen kapseloituneiden pneumokokkikantojen infektiolta tällaisten vasta-aineiden avulla. Tätä antigeenina toimivaa pintaproteiinia kutsutaan "pneumokokkimaiseksi A-pintaproteiiniksi" eli lyhyemmin PspA.

Julkaisussa McDaniel et al. (II), Microbial Pathogenesis 1:519—531, 1986, tarkastellaan tutkimuksia, jotka liittyvät PspA:n tunnusomaisten piirteiden selvittämiseen. Tällöin todettiin huomattavaa vaihtelua eri kantojen PspA-molekyylien keskuudessa, samoin kuin eroja eri vasta-aineiden tunnistamissa epitoopeissa.

Julkaisussa McDaniel et al. (III), J. Exp. Med. 165:381—394, 1987, tarkastellaan X-sidonnaisesti immuunivajaiden (XID) hiirten immunointia PspA:ta ilmentävillä kapseloitumattomilla pneumokokeilla, ei kuitenkaan isogeenisillä pneumokokeilla, joista PspA puuttuu, joka immunointi suojaa hiiret myöhemmältä kohtalokkaalta pneumokokki-infektiolta.

Julkaisussa McDaniel et al. (IV), Infect. Immun., 59:222—228, 1991, tarkastellaan hiirten immunointia yhdistelmä-DNA-teknisellä täysipituisella PspA-kappaleella, joka kykenee tuottamaan suojan kapselityyppiä 6A ja 3 olevia pneumokokkikantoja vastaan.

Julkaisussa Crain et al., Infect. Immun., 56: 3293—3299, 1990, tarkastellaan kaniinin antiseerumia, joka ilmaisee PspA:n 100 %:sta *S. pneumoniae* -kantojen kliinisiä ja laboratorioeristeitä (n=95). Kun *S. pneumoniae* -eristeet saatettiin reagoimaan seitsemän monoklonaalisen, PspA:ta vastaan vaikuttavan vasta-aineen kanssa, niin 57 *S. pneumoniae* -eristeessä todettiin 31 erilaista reaktiivisuuskuviota.

PspA-proteiinityyppi ei riipu kapselityypistä. Näyttää siltä, että geneettinen mutaatio tai ympäristön muutos on tehnyt mahdolliseksi suuren kantajoukon kehittymisen, jossa joukossa kannat poikkeavat huomattavasti toisistaan kapselin, PspA:n ja mah-

dollisesti muiden, rakenteeltaan vaihtelevien molekyylien suhteen. Eri kannoista peräisin olevien PspA-proteiinien vaihtelevuus on ilmeistä myös niiden molekyylipainojen perusteella, tämän molekyylipainon vaihdellessa alueella 67—99 kD. Havaitut erot periytyvät pysyvästi eivätkä ne johdu proteiinin hajoamisesta.

Immunointi yhdistelmä-DNA-teknisestä λ gt11-kloonista saadulla, osittain puhdistetulla PspA:lla tuotti suojan useille, erilaisia kapseli- ja PspA-tyyppejä edustaville *S. pneumoniae* -kannoille altistamista vastaan, kuten on kuvattu julkaisussa McDaniel et al. (IV); Infect. Immun. 59:222—228, 1991. Vaikka PspA:ta ilmentävät kloonit muodostettiinkin tämän julkaisun mukaisesti, tuote oli liukenematonta ja eristäminen solukappaleista hajotuksen jälkeen ei ollut mahdollista.

Vaikka proteiini vaihteleekin rakenteensa suhteen eri pneumokokkikantojen välillä, niin kuitenkin lukuisia ristireaktioita esiintyy kaikkien PspA-proteiinien välillä, minkä perusteella voidaan olettaa, että läsnä voi olla niin yhteisiä epitooppeja, että vain yksi PspA tai korkeintaan pieni lukumäärä PspA-proteiineja tuottaa suojan hyvin monia *S. pneumoniae* -kantoja vastaan.

Julkaistun kirjallisuuden, johon edellä on erityisesti viitattu, lisäksi keksijät ovat julkaisseet yhdessä työtovereidensa kanssa muuta yksityiskohtaista tietoa PspA-proteiineista seuraavissa julkaisuissa:

1. Abstracts of 89th annual Meeting of the American society for Microbiology, p. 125, item D-257, May 1989;
2. Abstracts of 90th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, p. 98, item D-106, May 1990;
3. Abstracts of 3rd International ASM Conference on Streptococcal Genetics, p. 11, item 12, June 1990;
4. Talkington et al, Infect. Immun. 59:1285—1289, 1991;
5. Yother et al (I), J. Bacteriol. 174:601—609, 1992; ja
6. Yother et al (II), J. Bacteriol. 174:610—618, 1992.

7. McDaniel et al (V), Microbiol. Pathogenesis, 13:261—268.

Hyödyllistä olisi saada aikaan PspA-proteiinia tai sen kappaleita, mukaan lukien erilaisista kannoista peräisin olevia PspA-proteiineja tai kappaleita sisältäviä koostumuksia antigeenisten, immunologisten tai rokotekoostumusten aikaansaamiseksi; ja vieläkin hyödyllisempää on osoittaa, että nämä erilaiset kannat voidaan ryhmitellä tai niiden tyyppi voidaan määrittää, jolloin saadaan aikaan perusta PspA-proteiinien tai niiden kappaleiden ristireaktiivisuuksille, ja jolloin siis saadaan aikaan keino tällaisissa koostumuksissa edustettujen kantojen määrittämiseksi (sekä yhden kannan testaamiseksi, ilmaisemiseksi tai diagnostoimiseksi muiden joukosta).

Edelleen, edullista olisi saada aikaan *pspA*:n kaltainen geeni tai *pspC*-geeni tiettyihin kantoihin sekä alukkeet (oligonukleotidit) tällaisen geenin sekä tässä geenissä ja *pspA*:ssa läsnä olevien säilyneiden alueiden tunnistamiseksi; esimerkiksi *S. pneumoniae* -kantojen ilmaisemiseksi, määrittämiseksi, eristämiseksi tai diagnostoimiseksi. Oletamme, ettei näitä käyttöjä ja etuja ole saatu tähän mennessä alalla aikaan.

Keksinnön tavoitteet ja yhteenveto

Tässä keksinnössä on saatu aikaan eristetty aminohappomolekyyli, joka käsittää jäännökset 1—115, 1—260, 192—588, 192—299 tai jäännökset 192—260 *Streptococcus pneumoniae* -eliön pneumokokkimaisesta A-pintaproteiinista.

Keksinnössä on saatu lisäksi aikaan tätä eristettyä aminohappomolekyyliä koodaava eristetty DNA-molekyyli, joka käsittää kappaleen *Streptococcus pneumoniae* -eliön pneumokokkimaisen A-pintaproteiinin geenistä.

Keksinnössä on myös saatu aikaan PCR-alukkeet tai hybridisaatiokoettimet, jotka käsittävät tämän eristetyn DNA-molekyylin.

Lisäksi keksinnössä on saatu aikaan antigeeninen, rokote- tai immunologinen koostumus, joka käsittää tämän aminohappomolekyylin.

Keksinnön piiriin kuuluu eristetty DNA-molekyyli, joka käsittää nukleotidit 1—26, 1967—1990, 161—187, 1093—1117 tai 1312—1331 tai 1333—1355 *Streptococcus pneumoniae* -eliön pneumokokkimaisen A-pintaproteiinin geenistä. Tätä DNA-molekyyliä voidaan käyttää PCR-alukkeena tai hybridisaatiokoettimena; ja tästä syystä keksintö käsittää PCR-alukkeen tai hybridisaatiokoettimen, joka käsittää tämän eristetyn DNA-molekyylin.

Keksinnön piiriin kuuluu myös sellainen eristetty DNA-molekyyli, johon kuuluva kappale on homologinen *Streptococcus pneumoniae* -eliön pneumokokkimaisen A-pintaproteiinin geenin osan kanssa. Tämä DNA on edullisesti seuraava (sisältäen homologisen, restriktiokohtia käsittävän osan, alan asiantuntijan kyetessä valitsemaan muut restriktiokohdat tai -sekvenssit tällaista DNA:ta varten tämän julkaisun perusteella):

CCGGATCCAGCTCCTGCACCAAAAAC;
GCGCGTCGACGGCTTAAACCCATTCACCATTGG;
CCGGATCCTGAGCCAGAGCAGTTGGCTG;
CCGGATCCGCTCAAAGAGATTGATGAGTCTG;
GCGGATCCCGTAGCCAGTCAGTCTAAAGCTG;
CTGAGTCGACTGGAGTTTCTGGAGCTGGAGC;
CCGGATGCCAGCTCCAHCTCCAGAAACTCCAG;
GCGGATCCTTGACCAATATTTACGGAGGAGGC;
CTTTTTGGTGCAGGAGCTGG;
GCTATGGGCTACAGGTTG;
CCACCTGTAGCCATAGC;
CCGCATCCAGCGTGCCTATCTTAGGGCTGGTT; ja
GCAAGCTTATGATATAGAAATTTGTAAC

(näin ollen, laajasti ottaen keksinnön piiriin kuuluu DNA, joka on homologinen *pspA*:n osien kanssa; sisältäen edullisesti vielä restriktiosekvenssejä).

Näitä DNA-molekyylejä voidaan käyttää PCR-alukkeina tai koettimina; ja näin ollen keksintö kattaa minkä tahansa tällaisen molekyylin käsittävän alukkeen tai koettimen.

Keksinnössä on edelleen saatu aikaan PCT-koetin/koettimia, joka erottaa *pspA*:n *pspA*:n kaltaisesta nukleotidisekvenssistä, sekä PCR-koetin/koettimia, joka hybridisoituu sekä *pspA*-nukleotidisekvenssiin että *pspA*:n kaltaiseen nukleotidisekvenssiin.

Lisäksi keksinnön kohteena on PspA-uute, joka on valmistettu menetelmällä, jossa: pneumokokkeja kasvatetaan ensimmäisessä alustassa, joka sisältää koliinikloridia, elävät pneumokokit eluoidaan koliinikloridia sisältävällä suolaliuoksella ja pneumokokkeja kasvatetaan toisessa alustassa, joka sisältää alkanoliamiinia ja joka ei sisällä olennaisesti lainkaan koliinia; sekä PspA-uute, joka on valmistettu tällä menetelmällä, jossa edelleen PspA puhdistetaan eristämällä Sepharose-geeliin sidottuun koliiniin perustuvalla affiniteettipylväällä. Myös nämä menetelmät kuuluvat keksinnön piiriin.

Keksinnön piiriin kuuluu näitä uutteita sisältävä immunologinen koostumus sekä täysipituista PspA-proteiinia käsittävä immunologinen koostumus.

Keksinnön kohteena on lisäksi menetelmä PspA-proteiinia sisältävän immunologisen koostumuksen immunogeenisyyden parantamiseksi, tämän koostumuksen käsittäessä PspA-proteiinin C-päätteen puoleisen osan.

Immunologinen koostumus, joka käsittää vähintään kaksi PspA-proteiinia. Tämä viimeksi mainittu immunologinen koostumus voi sisältää eri ryhmistä tai joukoista peräisin olevia PspA-proteiineja; nämä ryhmät tai joukot voivat perustua RFLP-(restriction fragment length polymorphism; restriktiokappaleiden pituuden monimuotoisuus) tai sekvenssitutkimuksiin (katso esim. kuvio 13).

Keksinnössä on edelleen saatu aikaan eristetty aminohappomolekyyli, joka käsittää *Streptococcus pneumoniae* -eliön pneumokokkimaisen C-pintaproteiinin eli PspC, jossa on alfa-kierteisiä, runsaasti proliinia sisältäviä ja toistuvia alueita, eristetty DNA-molekyyli, joka käsittää edellä mainittua PspC-proteiinia koodaavan pneumokokkimaisen C-pintaproteiinin geenin, sekä alukkeet ja hybridisaatiokoettimet, jotka koostuvat olennaisesti tästä eristetystä DNA-molekyylistä.

Esillä olevassa keksinnössä on edelleen saatu aikaan eristetty aminohappomolekyyli, joka käsittää *Streptococcus pneumoniae* -eliön pneumokokkimaisen C-pintaproteiinin PspC, jossa on alfa-kierteisiä, runsaasti proliinia sisältäviä ja toistuvia alueita ja jolla on olennaista homologiaa PspA-proteiiniin kuuluvan, suojan tuottavan alueen kanssa, sekä eristetty DNA-molekyyli, joka käsittää edellä mainittua PspC-proteiinia koodaavan pneumokokkimaisen C-pintaproteiinin geenin, sekä alukkeet ja hybridisaatiokoettimet, jotka koostuvat olennaisesti tästä eristetystä DNA-molekyylistä.

Lisäksi esillä olevassa keksinnössä on saatu aikaan PspC-proteiinia käsittävät immunologiset koostumukset.

Nämä ja muut suoritusmuodot esitetään tai ne ovat ilmeisiä seuraavan yksityiskohtaisen kuvauksen perusteella.

Kuvioiden lyhyt kuvaus

Kuviot 1A ja 1B esittävät: Pilkottujen plasmidimuodosteiden arviointi. Kuvio 1A: transformoiduista, etidiumbromidilla värjätyistä *E. coli* BL21(DE3) -kannoista eristettyjen plasmidien elektroforeesi 1 % agaroosigeelillä. Kaista 1: 1 kb:n DNA-tikkaat (koot esitetty kiloemäksinä, kb), kaista 2: pRCT125; kaista 3: pRC105, kaista 4: DBL5 pspA-istute, kaista 5: pRCT113, kaista 6: BG9739 pspA-istute, kaista 7: pRCT117 ja kaista 8: L81905 pspA-istute. Kuvio 1B: kuvion 1A geelin vastaava Southern blot -määritys käyttäen koettimena täysipituista Rx1 pspA:ta ja ilmaisten hybridisaatio esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Nuoli osoittaa plasmidimuodosteista saatuihin pilkottuihin 1,2 kb:n pspA-istutteisiin sekä luovuttajina toimineista pneumo-

kokkikannoista saatuihin, PCR-monistettuihin pspA-kappaleisiin, joita käytettiin kloonauksessa.

Kuvio 2 esittää: Katkennutta DBL5 PspA:ta sisältävien RCT105-kannan solufraktioiden arviointi. *E. coli* -solufraktioista saadut proteiinit erotettiin 10 % SDS-PAGE-menetelmällä, siirrettiin nitroselluloosalle ja koettimeksi lisättiin monoklonaalista vasta-ainetta MAb XiR278. Kaista 1: molekyylipainojen merkkiaineet (esitetty muodossa kDa), kaista 2: täysipituinen luonnollinen DBL5 PspA, kaista 3: indusoitumattomat solut, kaistat 4-6: indusoidut solut; 1 tunnin, 2 tunnin ja 3 tunnin pituinen IPTG-induktio, vastaavasti, kaista 7: periplasmiset proteiinit, kaista 8: sytoplasmiset proteiinit, ja kaista 9: liukenematon soluseinämä/kalvomateriaali.

Kuvio 3 esittää: CDM-ET:sta eristetyn R36A PspA-pylvään (80 ng) sekä vastaavan WG44.1-preparaatin yhtä suuren tilavuuden SDS-PAGE -määritys. Samanlaiset geelit on esitetty värjättyinä Bio-Rad:in hopeareagensseilla (A) tai immunotäplitettynä vasta-aineen PspA MAb XiR278(B) kanssa. R36A:sta eristetty PspA tuottaa tunnusomaiset monomeeri- (85 kDa) ja dimeerivyöhykkeet.

Kuvio 4 esittää: pneumokokki-eristeistä MC27 ja MC28 saadut soluhajotteet käsiteltiin SDS-PAGE -menetelmällä ja siirrettiin nitroselluloosalle, jolla muodostettiin Western-täplät seitsemällä monoklonaalisella PspA-vasta-aineella. 7D2 ilmaisi 82 kDa:n proteiinin kustakin eristeestä ja XiR278 sekä 2A4 ilmaisivat 190 kDa:n proteiinin kustakin eristeestä. Monoklonaaliset vasta-aineet MAb Xi64, Xi126, 1A4 ja SR4W4 eivät olleet reaktiivisia. Kannoilla MC25 ja MC26 saatiin samanlaiset tulokset.

Kuvio 5 (kuviot 5A ja 5B esittävät): kromosomaalisesta MC25-MC28 DNA:sta saadun HindIII-pilkkeen Southern-täplä kehittyi yli 95-prosenttisella ehdottomuudella. Vertailuna käytettiin Rx1 DNA-hajotetta. Täplään lisättiin koettimeksi LSM*pspA*13/2, joka on täysipituinen Rx1-koetin (kuvio 5) sekä LSM*pspA*12/6, Rx1 *pspA*:n 5'-koetin (kuvio 5). Kummassakin joukossa käytettiin samaa Rx1 DNA-pitoisuutta, mutta MC25-MC28 DNA:n pitoisuudet olivat kuviossa 5B puolet

kuviossa 5A käytetyistä pitoisuuksista, millä haluttiin välttää osittaisten pilkkeiden ilmaiseminen.

Kuvio 6 esittää: monistetun *pspA*:n RFLP. MC25:sta saatu *pspA* monistettiin PCR-menetelmällä käyttäen *pspA*:n 5'- ja 3'-alukkeita (vastaavasti LSM13 ja LSM). Monistettu DNA pilkottiin yksittäisillä restriktioendonukleaaseilla ennen elektroforeesia ja värjäystä etidiumbromidilla. Kaista 1 BclI, Kaista 2 BamHI, Kaista 3 BstNI, Kaista 4 PstI, Kaista 5 SacI, Kaista 6 EcoRI, Kaista 7 SmaI, Kaista 8 KpnI.

Kuvio 7 esittää PspA-proteiinia niin, että nähdään oligonukleotidien suhteellinen sijainti ja suuntautuminen.

Kuvio 8 esittää *S. pneumoniae* D39 Rx1 -perheen johdannaisia.

Kuviot 9 ja 10 esittävät *pspA*:sta tai monistetusta *pspA*:sta HhaI:llä tai Sau3AI saadun tuotteen elektroforeesia (vastaavasti kuvio 9 ja 10).

Kuvio 11 esittää kuudesta ryhmästä saadun kahden eristeen RFLP-kuvioita.

Kuvio 12 esittää kuudesta ryhmästä saadun kahden eristeen RFLP-kuvioita (käyttäen tuotteita, jotka oli saatu monistamalla SKH2:n ja LSM13:n kanssa).

Kuvio 13 esittää pääasiassa PspA:n N-päätteen puoleista sekvenssiä.

Kuvio 14 esittää: Pneumokokkieristeiden MC27 ja MC28 soluhajotteet, jotka on käsitelty SDS-PAGE-menetelmällä ja joista on muodostettu Western-täplät seitsemällä monoklonaalisella PspA-vasta-aineella; 7D2 ilmaisi 82 kDa:n proteiinin jokaisesta eristeestä, ja Xi278 ja 2A4 ilmaisivat 190 kDa:n proteiinin jokaisesta eristeestä; monoklonaaliset vasta-aineet Xi64, Xi126, 1A4 ja SR4W4 eivät olleet reaktiivisia; kannoilla MC25 ja MC26 tuottivat samanlaiset tulokset (ei esitetty).

Kuvio 15A ja 15B esittävät kromosomaalisesta MC25-28 DNA:sta saadun HindIII-pilkkeen Southern-täplää, käyttäen vertailuna Rx1 DNA-pilkettä; täplässä käytettiin koettimena muodostetta LSM*pspA*13/2, joka on täysipituinen Rx1-koetin (A), sekä muodostetta LSM*pspA*12/6, joka on Rx1 *pspA*:n 5'-koetin (B); kummassakin joukossa käytettiin samaa Rx1 DNA-pitoisuutta, mutta MC25-MC28 DNA:n pitoisuudet olivat B:ssä puolet A:ssa käytetyistä pitoisuuksista, millä haluttiin välttää osittaisten pilkkeiden ilmaiseminen.

Kuviot 15C ja 15D esittävät alukkeiden LSM13, LSM2, LSM12 ja LSM6 nukleotidisekvenssejä sekä koettimien LSM*pspA*13/2 ja LSM*pspA*12/6 nukleotidisekvenssejä.

Kuvio 16 esittää monistetun *pspA*:n RFLP:tä, jossa MC25:stä saatu PspA monistettiin PCR-reaktiolla käyttäen *pspA*:n 5'- ja 3'-alukkeita (vastaavasti LSM13 ja LSM2); monistettu DNA pikottiin yksittäisillä restriktioendonukleaaseilla ennen elektroforeesia ja värjäystä etidiumbromidilla; entsyymiä BclI käytettiin kaistassa 1; BamHI kaistassa 2; BstNI kaistassa 3; PstI kaistassa 4; SacI kaistassa 5; EcoRI kaistassa 6; SmaI kaistassa 7; ja KpnI kaistassa 8.

Kuvio 17 esittää oligonukleotidien asemaa ja suuntautumista *pspA*:n koodaamien domeenien suhteen; kuvion alareunassa olevat numerot esittävät aminohappoja Rx1-kannasta peräisin olevassa kypsässä PspA-polypeptidissä ja nuolet tarkoittavat oligonukleotidien suhteellista asemaa (ei mittakaavassa) ja suuntautumista.

Kuvio 18 esittää pZero-vektorin restriktiokarttaa.

Kuvio 19 esittää muodosteiden SKH2, LSM13, N192 ja C588 nukleotidisekvenssejä.

Kuviossa 20 verrataan PspA:n ja PspC:n rakennetta; PspA:ssa on pienempi alfa-kierteinen alue ja se ei sisällä suoraan toistuvia alueita alfa-kierteessä (esitetty katkoviivoilla); PspA:n ja PspC:n välillä homologiset alfa-kierteiset alueet on merkitty katkoviivoilla); PspA:n ja PspC:n välillä homologiset alfa-kierteiset alueet on esitetty viivoitettuna kuviona; ja PCR-alukkeet on esitetty nuolilla.

Kuvio 21 esittää PspC:n aminohappo- ja nukleotidisekvenssiä, joissa oletetut -10- ja -35-alueet on alleviivattu, ja ribosomin sitoutumiskohta on esitetty pikkukirjaimin.

Kuvio 22 esittää PspA:n ja PspC:n Bestfit-analyysia; prosentuaalinen samanlaisuus on 69 % ja prosenttinen samankaltaisuus on 77 %; PspA:n aminohapot ovat alarivillä (1-588) ja PspC:n aminohapot ovat ylärivillä (249-891) ja katkoviiva tarkoittaa samanlaisuutta.

Kuvio 23 esittää PspC:n alfa-kierteen kiertynyttä käämimäistä rakennetta; ne aminohapot, jotka eivät ole läsnä tässä kiertyneessä käämimäisessä rakenteessa, on esitetty oikeassa sarakkeessa.

Kuvio 24 esittää PspC:n alfa-kierteiseen alueeseen kuuluvien toistuvien alueiden matriisikäyrävertailua.

Kuvio 25 esittää LXS532:n (PspC.D39) alfa-kierteisen alueen ja proliinialueen sekvenssiä.

Kuviossa 26 verrataan toisiinsa *pspA*.RX1:n ja *pspC*.D39:n nukleotideja.

Kuvio 27 esittää *pspC*.EF6797:n ja *pspC*.D39:n Bestfit-analyysia.

Kuviossa 28 verrataan toisiinsa EF6797:n ja D39:n PspC:n aminohappoja.

Kuviossa 29 verrataan PspC.D39:n ja PspA.Rx1:n aminohappoja.

Yksityiskohtainen kuvaus

Tässä oletetaan, että tähän julkaisuun viittauksella sisällytetyt hakemukset ovat tiedossa ja että niihin on tutustuttu; ja näissä hakemuksissa on julkaistu *pspA*:n sekvenssi ja sen tiettyjä osia sekä PspA ja PspA:ta sisältävät koostumukset.

Kuten edellä sekä seuraavissa esimerkeissä on tarkasteltu, keksinnön kohteena ovat katkennut PspA, esimerkiksi PspA:n C-päätteen puoleinen osa asemasta 192 alkaen, kuten PspA:n aminohapot 192—588 ("BC100"), 192—299 sekä 192—260, jotka saavat aikaan ristisuojan, sekä tällaista katkennutta PspA:ta koodaava DNA (joka vahvistaa näiden useimmissa PspA-proteiineissa homologisten aminohappoalueiden koodautumista).

Keksinnön piiriin kuuluvat edelleen *pspA*:n kaltainen geeni eli *pspC*-geeni sekä sen osat (esimerkkeinä koettimet, alukkeet), jotka voivat hybridisoitua siihen ja/tai monistaa tämän geenin, sekä sellaiset DNA-molekyylit, jotka hybridisoituvat *pspA*-geeniin siten, että jonkin erityisen pneumokokkikannan läsnäolo voidaan varmistaa hybridisaatiomäärityksellä ja/tai monistuksella; ja tämän keksinnön avulla PspC voidaan tuottaa *pspA*:n kaltaisen sekvenssin tai *pspC*-sekvenssin avulla (jota PspC:tä voidaan käyttää PspA:n tavoin).

Keksinnön kohteena ovat edelleen oligonukleotidikoettimet ja/tai -alukkeet, jotka reagoivat useiden, ellei peräti kaikkien kantojen *pspA*:n ja/tai *pspC*:n kanssa siten, että mikä tahansa pneumokokkikanta kyetään tunnistamaan, ilmaisemaan tai diagnostoimaan, sekä tällaisista koettimista ja/tai alukkeista ilmentyneet tuotteet, joissa saattaa esiintyä mielenkiinnon kohteena olevia, ristireaktiivisia epitooppeja.

PspA:n ja/tai *pspC*:n toistuva alue on hyvin säilynyt, joten esillä olevassa keksinnössä saadaan aikaan tämän alueen oligonukleotidikoettimet tai -alukkeet, jotka reagoivat useimpien, ellei peräti kaikkien kantojen kanssa, ja jolloin saadaan aikaan diagnostiset määritykset sekä keino mielenkiinnon kohteena olevien epitooppien tunnistamiseksi.

Tämä keksintö osoittaa, että *pspC*-geeni on homologinen *pspA*-geenin kanssa johtosekvenssin, runsaasti proliinia sisältävän alueen ensimmäisen osan sekä toistuvan alueen suhteen; mutta nämä geenit eroavat toisistaan niissä olevien, runsaasti proliinia sisältävien alueiden toisen osan sekä PspA:n 17 aminohaposta koostuvaa häntää koodaavan geenin äärimmäisen 3'-pään suhteen. *PspC*-geenin tuotteesta

odotetaan puuttuvan C-päätteen häntä, minkä perusteella ankkuroitumisen oletetaan olevan erilaista kuin PspA:ssa. Näin ollen pneumokokki-infektion estämiseksi tavoitteena on mahdollisuus vaikuttaa lääkeaineen avulla sellaisiin toimintoihin kuten pintasitoutumiseen *pspA*- ja *pspC*-geenien toistuvien alueiden koodautumisessa, tai ilmentyneiden tuotteiden toistuviin alueisiin.

Edelleen, keksinnön avulla voidaan osoittaa myös muiden *pspA*-homologisten sekvenssien olemassaolo *pspA*- ja *pspC*-sekvenssien lisäksi. Kuten edellä on mainittu, keksinnön piiriin kuuluvat oligonukleotidikoettimet tai -alukkeet, jotka erottavat *pspA*- ja *pspC*-sekvenssit toisistaan, ja joista voidaan mainita diagnostista ilmaisemista tai eristämistä ajatellen käyttökelpoiset muodosteet LSM1 ja LSM2; sekä LSM1 ja LSM10 tai LSM1 ja LSM7, jotka monistavat osan *pspC*-geenistä, erityisesti osan siitä geenistä, johon on koodautunut antigeeninen, immunologinen tai suojaava proteiini.

Keksinnön kohteena on lisäksi menetelmä luonnollisessa muodossa olevan PspA-proteiinin eristämiseksi kasvattamalla pneumokokkeja alustassa, joka sisältää suurena pitoisuutena (noin 0,9—1,4 %, edullisesti 1,2 %) koliinikloridia, eluoimalla elävät pneumokokit suolaliuoksella, joka sisältää koliinikloridia esimerkiksi noin 1—3 %, edullisesti 2 %, sekä kasvattamalla pneumokokkeja alustassa, jonka alustan koliini on korvattu lähes täydellisesti tai olennaisen täydellisesti alemmalla alkanoliamiinilla, esimerkkeinä C_{1-6}-, edullisesti C_2-alkanoliamiini, eli edullisesti C_2-alkanoliamiinilla kuten edullisesti etanoliamiinilla [esimerkiksi 0,0000005—0,0000015 %, edullisesti 0,000001 % koliinikloridia plus 0,02—0,04 %, edullisesti 0,03 % alkanoliamiinia (etanoliamiinia)]. Tämän jälkeen tällaisista pneumokokeista saatu PspA edullisesti eristetään Sepharose-geeliin sidottuun koliiniin perustuvasta affiniteettipylväästä, jolloin saadaan erittäin puhdasta PspA:ta. Tällainen eristetty ja/tai puhdistettu PspA on erittäin immunogeenistä ja sitä voidaan käyttää antigeenisessa, immunologisessa tai rokotekoostumuksessa.

Alkanoliamiinin (eikä koliinin) läsnä ollessa kasvatettujen pneumokokkien kasvualusta sisältää PspA:ta ja se on itsessään erittäin immunogeenista ja tästä syystä sitä

voidaan käyttää antigeenisena, immunologisena tai rokotekoostumuksena; ja sen valmistus on suhteellisen halpaa. PspA-proteiinin yhtä mikrogrammaa kohden, alkanoliamiinia sisältävässä alustassa läsnä oleva PspA on paljon suojaavampaa kuin muilla keinoin, esimerkiksi uutteista eristetty PspA. Vaikka ohessa ei halutakaan vältämättä rajoittua mihinkään erityiseen teoriaan, niin kuitenkin ennen eristystä läsnä olevilla muilla komponenteilla saattaa olla synergististä vaikutusta PspA-proteiiniin, tai yksinkertaisesti PspA on suojaavampaa (antigeenisempaa) ennen eristystä ja/tai puhdistusta (mikä osoittaa, että aktiivisuutta menetetään eristys- ja/tai puhdistusvaiheessa).

Keksinnön kohteena ovat edelleen PspA:n N-päätteen 115 aminohappoa, jotka ovat käyttökelpoisia mielenkiinnon kohteena olevan epitoopin käsittäviä koostumuksia, immunologisia tai rokotekoostumuksia ajatellen, sekä niitä koodaava DNA, jonka avulla nämä N-päätteen aminohapot voidaan valmistaa yhdistelmä-DNA-tekniikkaa käyttäen, tai jota voidaan käyttää koettimena ja/tai alukkeena hybridisaatiossa ja/tai monistuksessa tunnistamista, ilmaisemista tai diagnoositoimenpiteitä varten.

Tämä keksintö osoittaa edelleen, että *pspA* RFLP -joukkojen keskuudessa esiintyy ryhmittymistä. Tällä tavalla saadaan aikaan menetelmä erilaisista PspA-proteiineista muodostuvien joukkojen tunnistamiseksi *pspA*-geenien RFLP-kuvioiden perusteella sekä keino erilaisten PspA-proteiinien saamiseksi antigeeniseen, immunologiseen tai rokotekoostumukseen; sekä menetelmä PspA:n klonotyyppien tunnusomaisten piirteiden selvittämiseksi PspA:n RFLP-kuvioiden perusteella. Näin ollen keksinnössä saadaan aikaan oligonukleotidit, joiden avulla voidaan monistaa useimmat, esimerkiksi suurin osa, ellei peräti kaikki *S. pneumoniae* -eliöt, jolloin *S. pneumoniae* -eliöiden suurimman osan, ellei peräti niiden kaikkien RFLP-analyysi saadaan mahdolliseksi.

Keksinnössä saadaan myös aikaan PspC, jonka molekyylipaino on arviolta 105 kD, ja jonka arvioitu pI on 6,09, ja joka käsittää alfa-kierteisen alueen, sitä seuraavan, runsaasti proliinia sisältävän alueen ja toistuvan alueen. PspA:n suuri, ristisuojaava alue käsittää C-päätteen puoleisen kolmanneksen alfa-kierteisestä alueesta (PspA:n

jäännösten 192 ja 260 välissä), joka alue saa aikaan viidestä ristisuojaavasta monoklonaalisesta vasta-aineesta neljän sitoutumisen, ja tämän alueen käsittävät PspA-kappaleet voivat johtaa ristisuojaavaan immuniteettiin hiirissä. PspC:n ja PspA:n välinen homologia alkaa PspA:n aminohapon 148 kohdalta ja sisältää siis alueen aminohaposta 192 aminohappoon 299 sekä koko sen PspC-sekvenssin, jonka C-pääte on aminohapon 486 kohdalla. Koska PspA:n ja PspC:n sekvenssit ovat olennaisesti homologiset mielenkiinnon kohteena olevia epitooppeja käsittävässä alueessa, jonka tiedetään saavan aikaan suojan, niin PspC käsittää todennäköisesti PspA:ssa esiintyvien epitooppien kaltaisia, mielenkiinnon kohteena olevia epitooppeja. PspA:n tämän alueen, eli aminohappojen 148 ja 299 välisen alueen suhteen spesifisten vasta-aineiden pitäisi ristireagoida PspC:n kanssa ja näin ollen tuottaa suoja reagoimalla PspC:n ja PspA:n kanssa. Samoin on odotettavaa, että immunointi PspC-proteiinilla tuottaa PspA:ta vastaan ristisuojaavia vasta-aineita.

Mielenkiinnon kohteena oleva epitooppi on antigeeni tai immunogeeni tai sen immunologisesti aktiivinen kappale eläin- tai ihmislääketieteellisesti merkittävästä patogeenista tai toksiinista.

Esillä olevassa keksinnössä on saatu aikaan immunogeeninen, immunologinen tai rokotekoostumus, joka sisältää mielenkiinnon kohteena olevan pneumokokkiepitoopin sekä farmaseuttisesti hyväksyttävää kantajaa tai laimenninta. Mielenkiinnon kohteena olevan pneumokokkiepitoopin sisältävä immunologinen koostumus tuottaa immunologisen vasteen, joka on joko paikallinen tai systeeminen. Tämä vaste voi olla suojaava, mikä ei ole kuitenkaan välttämätöntä. Samoin mielenkiinnon kohteena olevan pneumokokkiepitoopin sisältävä immunogeeninen koostumus tuottaa paikallisen tai systeemisen immunologisen vasteen, joka voi olla, ei kuitenkaan välttämättä, suojaava. Rokotekoostumus tuottaa paikallisen tai systeemisen suojaavan vasteen. Näin ollen käsitteet "immunologinen koostumus" ja "immunogeeninen koostumus" sisältävät käsitteen "rokotekoostumus" (sillä kaksi ensin mainittua käsitettä voivat olla suojaavia koostumuksia).

Niinpä tässä keksinnössä on myös saatu aikaan menetelmä immunologisen vasteen herättämiseksi isäntänisäkkäässä siten, että tälle isännälle annetaan immunogenista, immunologista tai rokotekoostumusta, joka käsittää mielenkiinnon kohteena olevan pneumokokkiepitoopin sekä farmaseuttisesti hyväksyttävää kantajaa tai laimenninta.

DNA, johon mielenkiinnon kohteena oleva pneumokokkiepitooppi on koodautunut, voi olla DNA, joka koodaa täysipituista PspA:ta, PspC:tä tai niiden kappaleita. PspA:n tai PspC:n kappaletta koodaavaan sekvenssiin voi olla koodautunut se PspA:n tai PspC:n osa, joka sisältää mielenkiinnon kohteena olevan epitoopin kuten suojan tuottavan epitoopin proteiinista.

S. pneumoniae Rx1 -kannasta on tunnistettu sellaisia PspA- ja PspC-alueita, jotka eivät ainoastaan sisällä suojan aikaansaavia epitooppeja, vaan jotka ovat myös riittävän ristireaktiivisia muista *S. pneumoniae* -kannoista peräisin olevien PspA-proteiinien kanssa siten, että ne ovat sopivia ehdokkaita rokotteeseen, immunologiseen tai immunogeeniseen koostumukseen sisällytettäväksi PspA-alueeeksi. PspA:n epitooppisiin alueisiin kuuluvat jäännökset 1—115, 1—314, 192—260 ja 192—588. PspA-kappaleita koodaava DNA voi olla sellainen DNA, johon edellä mainitut PspA:n epitooppiset alueet ovat koodautuneet; tai kysymyksessä voi olla DNA, joka koodaa PspA:n päällekkäin meneviä kappaleita, esimerkiksi kappale aminohaposta 192 aminohappoon 588 sisältää kappaleen 192—260 ja kappale aminohaposta 1 aminohappoon 314 sisältää kappaleen 1—115 ja 192—260.

Mitä tulee mielenkiinnon kohteena oleviin epitooppeihin, alan asiantuntija kykenee määrittämään epitoopin peptidiin tai polypeptidiin kuuluvasta, immunologisesti hallitsevasta alueesta ja sen avulla sitä koodaavan DNA-sekvenssin tämän peptidin tai polypeptidin tunnetun aminohapposekvenssin ja vastaavaan DNA-sekvenssin sekä näiden erityisten aminohappojen luonteen (kuten koon, varauksen) perusteella sekä kodonikirjaston avulla ilman tarpeetonta kokeilua.

Yleisessä menetelmässä, jolla voidaan määrittää se, mitä osaa proteiinista voidaan käyttää immunologisessa koostumuksessa, keskitytään mielenkiinnon kohteena olevan

antigeenin kokoon ja sekvenssiin. "Yleisesti, koska suurissa proteiineissa on enemmän mahdollisia determinantteja, ne ovat parempia antigeeneja kuin pienet proteiinit. Mitä vieraampi antigeeni, toisin sanoen mitä vähemmän samankaltaisuutta sietokykyä indusoiviin itsekonfiguraatiohin, sitä tehokkaampi se on ajatellen immuunivasteen syntymistä." Ivan Roitt, Essential Immunology, 1988.

Mitä tulee kokoon, alan asiantuntija kykenee maksimoimaan virusvektoriin istutettavaksi tarkoitettuun DNA-sekvenssiin koodautuneen proteiinin koon (ottaen huomioon vektoriin liittyvät pakkaamisrajoitukset). Istutetun DNA:n koon minimoimiseksi, samalla ilmentyneen proteiinin koko maksimoiden, tästä DNA-sekvenssistä on voitu poistaa introneita (geenialueita, jotka kopioituvat, mutta jotka leikkautuvat myöhemmin irti primaarista RNA-kopiosta).

Pienimmillään tämä DNA-sekvenssi voi koodata vähintään 8 tai 9 aminohapon pituista peptidiä. Tämä on se vähimmäispituus, joka peptidillä on oltava, jotta se kykenisi stimuloimaan CD4+ T-soluvasteen (joka tunnistaa viruksen infektoimat solut tai syöpäsolut). 13—25 aminohappoa oleva peptidin vähimmäispituus on käyttökelpoinen CD8+ T-soluvasteen stimuloimiseksi (joka vaste tunnistaa erityisen antigeenin käsittävät solut, jotka ovat "nielaisseet" patogeenin). Katso Kendrew, edellä. Koska nämä ovat kuitenkin vähimmäispituuksia, niin nämä peptidit saavat aikaan todennäköisesti immunologisen vasteen eli vasta-aine- tai T-soluvasteen; mutta pitempi peptidi on edullinen suojaavaa vastetta ajatellen (esimerkiksi rokotekoostumuksesta).

Mitä tulee sekvenssiin, tämä DNA-sekvenssi koodaa edullisesti vähintään sellaisia peptidialueita, jotka tuottavat vasta-ainevasteen tai T-soluvasteen. Eräs menetelmä T- ja B-soluepitooppien määrittämiseksi käsittää epitooppikartoituksen. Mielenkiinnon kohteena oleva proteiini "pilkotaan päällekkäin meneviksi peptideiksi proteolyyttisillä entsyymeillä. Tämän jälkeen testataan yksittäisten peptidien kyky sitoutua luonnollisessa muodossa olevan proteiinin tuottamaan vasta-aineeseen tai indusoida T-solujen tai B-solujen aktivoitumista. Tämä lähestymistapa on ollut erityisen käyttökelpoinen T-soluepitooppien kartoituksessa, koska T-solu tunnistaa MHC-molekyyleihin (MCH

= major histocompatibility complex) kompleksoituneet lyhyet lineaariset peptidit. Tämä menetelmä ei ole yhtä tehokas B-soluepitooppien määrittämiseksi", koska B-soluepitoopit ovat usein muunlaisia kuin lineaarisia aminohapposekvenssejä, niiden ollessa tuloksena poimuttuneen kolmiulotteisen proteiinin tertiäärirakenteesta. Janis Kuby, Immunology, (1992), sivut 79—80.

Toinen menetelmä mielenkiinnon kohteena olevan epitoopin määrittämiseksi on valita proteiinista ne alueet, jotka ovat hydrofiilisia. Hydrofiiliset jäännökset ovat usein proteiinin pinnalla ja näin ollen ne muodostavat usein ne proteiinialueet, joihin vasta-aineet pääsevät. Janis Kuby, Immunology, (1992), sivu 81.

Vielä eräs muu menetelmä mielenkiinnon kohteena olevan epitoopin määrittämiseksi on toteuttaa antigeenin (täysipituinen) ja vasta-aineen välisestä kompleksista röntgen-kristallografinen sädeanalyysi. Janis Kuby, Immunology, 81992), sivu 80.

Edelleen, eräs muu menetelmä mielenkiinnon kohteena olevan epitoopin, joka voi tuottaa T-soluvasteen, valitsemiseksi on tunnistaa proteiinisekvenssistä mahdolliset, HLA-ankkuria sitovat yksiköt, jotka ovat peptidisekvenssejä, joiden tiedetään sitoutuvan todennäköisesti MHC-molekyyliin.

Peptidin, jota epäillään T-soluvasteen kehittäväksi epitoopiksi, tulisi olla esillä MHC-kompleksissa. Tämä peptidi sisältää edullisesti sopivia ankkuriyksiköitä MHC-molekyyleihin sitoutumista varten ja sen tulisi sitoutua riittävän suurella affiniteetilla niin, että syntyy immuunivaste. Huomioon otettavia tekijöitä ovat: immunoitavan potilaan (selkärankainen, eläin tai ihminen) HLA-tyyppi, proteiinin sekvenssi, sopivien ankkuriyksiköiden läsnäolo sekä tämän peptidisekvenssin esiintyminen muissa elintärkeissä soluissa.

Immuunivaste syntyy yleensä seuraavalla tavalla: T-solut tunnistavat proteiineja vain, jos proteiini on pilkkoutunut pienemmiksi peptideiksi ja on esillä toisen solun pinnalla sijaitsevassa, niinkutsutussa suuressa histokompatibiliteettikompleksissa (major histocompatibility complex; MHC). Nämä MHC-kompleksit kuuluvat kahteen

eri luokkaan eli luokkaan I ja luokkaan II, ja kumpikin luokka koostuu monista erilaisista alleeleista. Eri potilailla on eri tyyppisiä MHC-kompleksialleeleja; heidän sanotaan olevan "erilaista HLA-tyyppiä" (HLA = human leucosyte antigen).

Luokkaan I kuuluvia MHC-komplekseja esiintyy käytännöllisesti katsoen jokaisessa solussa ja ne tuovat esiin peptidejä solun sisäpuolella tuotetuista proteiineista. Näin ollen luokkaan I kuuluvien MHC-kompleksien avulla voidaan tappaa virusten infektoimia soluja tai sellaisia soluja, jotka ovat muuttuneet syöpäsoluiksi onkogeenin ilmentymisen seurauksena. T-solut, joiden pinnalla on CD4:ksi kutsuttua proteiinia, sitoutuvat luokkaan I kuuluvia MHC-komplekseja käsittäviin soluihin ja erittävät lymfokiineja. Lymfokiinit stimuloivat vasteen; soluja saapuu paikalle ja ne tappavat viruksen infektoiman solun.

Luokkaan II kuuluvia MHC-komplekseja esiintyy ainoastaan antigeenin esiin tuovien solujen pinnalla ja niitä käytetään kiertävistä patogeeneista, jotka nämä antigeenin esiin tuovat solut ovat endosytoineet, peräisin olevien peptidien esiin tuomiseen. T-solut, joissa on CD8:ksi kutsuttua proteiinia, sitoutuvat luokkaan II kuuluvia MHC-komplekseja käsittäviin soluihin ja tuhoavat solut lyyttisten kerästen eksosytoosilla.

Niistä yleisistä tekijöistä, joiden perusteella voidaan määrittää, onko proteiini mielenkiinnon kohteena oleva, T-soluvasteen tuottava epitooppi, voidaan mainita: peptidin pituus - peptidin tulisi olla vähintään 8 tai 9 aminohapon pituinen sopiakseen luokkaan I kuuluvaan MHC-kompleksiin ja vähintään 13—25 aminohapon pituinen sopiakseen luokkaan II kuuluvaan MHC-kompleksiin. Tämä pituus on peptidin vähimmäispituus MHC-kompleksiin sitoutumista ajatellen. Peptidit ovat edullisesti mainittuja pituuksia pitempiä, koska solut voivat pilkkoa ilmentyneitä peptidejä. Peptidin tulisi sisältää sopiva ankkuriryhmä, jonka avulla se voi sitoutua luokkaan I tai luokkaan II kuuluviin erilaisiin molekyyleihin riittävän suurella spesifisyydellä immuunivasteen kehittymistä ajatellen [katso Bocchia, M. et al., Specific Binding of Leukemia Oncogene Fusion Protein Peptides to HLA Class I Molecules, Blood 85: 2680—2684; Englehard, VH, Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules, Ann. rev. Immunol. 12:181 (1994)]. Tämä voidaan toteuttaa

ilman turhaa kokeilua vertaamalla mielenkiinnon kohteena olevan proteiinin sekvenssiä MHC-molekyyleihin liittyvien peptidien julkaistuihin rakenteisiin. T-soluresepto-reiden tunnistamat proteiiniepitoopit ovat peptidejä, jotka ovat syntyneet proteiinimolekyylin entsymaattisen hajoamisen seurauksena ja jotka ovat esillä solun pinnalla luokkaan I tai luokkaan II kuuluviin MHC-molekyyleihin liittyneinä.

Edelleen, alan asiantuntija voi varmistaa mielenkiinnon kohteena olevan epitoopin vertaamalla proteiinisekvenssiä proteiinitietokannassa lueteltuihin sekvensseihin. Ne proteiinialueet, joilla on vain vähän tai ei lainkaan homologiaa, ovat parempi valinta tämän proteiinin epitoopiksi, ja tästä syystä ne ovat käyttökelpoisia rokote- tai immunologisessa koostumuksessa. Niitä alueita, jotka ovat hyvin homologisia elinvoimaisissa soluissa läsnä olevien, yleisesti esiintyvien sekvenssien kanssa, tulisi välttää.

Edelleen, eräissä muussa menetelmässä yksinkertaisesti tuotetaan tai ilmaistaan mielenkiinnon kohteena olevan proteiinin osia, tuotetaan monoklonaalisia vasta-aineita mielenkiinnon kohteena olevan proteiinin näille osille, minkä jälkeen selvitetään, estävätkö nämä vasta-aineet patogeenin, josta proteiini oli peräisin, kasvun *in vitro*. Alan asiantuntija voi käyttää tässä julkaisussa sekä muita alalla esitettyjä suuntaviivoja mielenkiinnon kohteena olevan proteiinin osien tuottamiseksi tai ilmentämiseksi, jolloin niiden avulla voidaan määrittää, estävätkö niitä vastaan vaikuttavat vasta-aineet kasvun *in vitro*. Esimerkiksi, alan asiantuntija voi tuottaa mielenkiinnon kohteena olevan proteiinin osia: valitsemalla proteiinista 8—9 tai 13—25 aminohapon pituisia osia, valitsemalla hydrofiilisia alueita, valitsemalla alueita, joiden on todettu sitoutuvan antigeenin ja (täysipituisen) vasta-aineen välisestä kompleksista saatujen röntgendiffraktiotietojen perusteella, valitsemalla alueita, jotka eroavat sekvenssinsä suhteen muista proteiineista, valitsemalla mahdolliset HLA-ankkurin sitoutumisyksiköt, tai millä tahansa näiden menetelmien tai muiden, alalla tunnettujen menetelmien yhdistelmällä.

Vasta-aineiden tunnistamat epitoopit ilmentyvät proteiinin pinnalla. Kaikkein todennäköisimmin vasta-ainevasteen tuottavien proteiinialueiden määrittämiseksi alan

asiantuntija voi edullisesti toteuttaa epitooppikartoituksen käyttämällä edellä kuvattuja yleisiä menetelmiä tai muita alalla tuttuja kartoitusmenetelmiä.

Kuten edellä esitetyn perusteella voidaan todeta, alan asiantuntija voi varmistaa ilman tarpeetonta kokeilua tähän julkaisuun ja alan tietämykseen nojautuen mielenkiinnon kohteena olevan epitoopin aminohapposekvenssin ja vastaavan DNA-sekvenssin T-solu-, B-solu- ja/tai vasta-ainevasteen saamiseksi. Lisäksi viitataan julkaisuun Gefter et al., US-patenttijulkaisu nro 5 019 384, vastaava patentti myönnetty 28. toukokuuta 1991, sekä siinä siteerattuihin asiakirjoihin, jotka sisällytetään oheen tällä viittauksella (huomaa erityisesti tämän patenttijulkaisun luku "Asiaan liittyvä kirjallisuus" sekä tämän patenttijulkaisun palsta 13, jossa esitetään, että "suuri joukko epitooppeja on määritelty hyvin monien, mielenkiinnon kohteena olevien organismien tapauksessa. Erityisen mielenkiintoisia ovat ne epitoopit, joihin neutraloivat vasta-aineet kohdistuvat. Tällaisia epitooppeja on esitetty lukuisissa, kohdassa "Asiaan liittyvä kirjallisuus" siteeratuissa viitteissä.)

Edelleen, tämä keksintö osoittaa, että useampia kuin yksi serologisesti täydentävä PspA-molekyyli voi olla läsnä antigeenisessa, immunologisessa tai rokotekoostumuksessa paremman vasteen, esimerkiksi suojan tuottamiseksi esimerkiksi erilaisia pneumokokkikantoja vastaan; ja tässä esimerkissä on saatu aikaan järjestelmä PspA-molekyylien valitsemiseksi moniarvoista koostumusta varten, joka järjestelmä käsittää ristisuojauksen arvioinnin siten, että saadaan aikaan mahdollisimman tehokas koostumus.

Keksinnön mukaisissa koostumuksissa läsnä olevan antigeenin, esimerkiksi PspA:n tai sen katkenneen osan sekä valinnaisen apuaineen määrän määritys sekä näiden koostumusten valmistus voivat tapahtua farmaseuttisen alan tai eläinlääketieteen asiantuntijoille hyvin tuttujen standarditekniikoiden mukaisesti. Erityisesti, antigeenin ja apuaineen määrä keksinnön mukaisissa koostumuksissa sekä annettavat annokset määritetään lääketieteen ja eläinlääketieteen asiantuntijoille hyvin tutuilla tekniikoilla ottaen huomioon sellaiset tekijät kuten erityinen antigeeni, apuaine (mikäli läsnä), kyseessä olevan potilaan ikä, sukupuoli, paino, laji ja tila, sekä antamistapa. Alan

asiantuntija kykenee selvittämään helposti tämän julkaisun perusteella (katso esimerkiksi esimerkit) esimerkiksi erityisten PspA-antigeenien annokset sopiville isännille, joissa immunologinen vaste on toivottava, samoin kuin niiden kanssa tyypillisesti annettavan apuaineen määrän. Niinpä alan asiantuntija voi määrittää helposti keksinnön kohteena olevien menetelmien mukaisesti annettavissa koostumuksissa läsnä olevan antigeenin ja valinnaisen apuaineen määrän. Tyypillistä on, että apuainetta käytetään yleensä 0,001-50 painoprosenttisena liuoksena fosfaatilla puskuroidussa suolaliuoksessa ja että antigeenia on läsnä mikrogrammojen tai milligrammojen suuruusluokkaa olevana määränä, esimerkiksi noin 0,0001—5 paino-%, edullisesti noin 0,0001—1 paino-%, edullisimmin noin 0,0001—0,05 paino-% (katso esimerkiksi alla tai ohessa siteeratuissa patenttihakemuksissa olevat esimerkit).

Tyypillisesti kuitenkin antigeeni on läsnä mikrogrammoista milligrammoihin olevissa määrissä tai noin 0,001—20 p-%, edullisesti noin 0,01—10 p-% ja edullisimmin noin 0,05—5 p-% (katso esimerkit alla).

Luonnollisestikin minkä tahansa, eläimelle tai ihmiselle annettavaksi tarkoitetun koostumuksen, sen sisältämät komponentit mukaan lukien, sekä minkä tahansa erityisen antamismenetelmän tapauksessa on edullista määrittää: myrkyllisyys esimerkiksi määrittämällä tappava annos (lethal dose; LH) sekä LD_{50} sopivaan eläimeen, esimerkiksi jyrsijään kuten hiireen perustuvan eläinmallin avulla; koostumuksen (koostumusten) annostus, siinä läsnä olevien komponenttien pitoisuus ja tämän koostumuksen (koostumusten) antamisen ajoitus sopivan immunologisen vasteen tuottamiseksi esimerkiksi titraamalla seeruminäytteet ja analysoimalla niistä vasta-aineet tai antigeenit esimerkiksi ELISA- ja/tai RFFIT-analyysilla. Nämä määritykset eivät edellytä alan asiantuntijan tietämykseen, tähän julkaisuun ja ohessa siteerattuihin asiakirjoihin perustuvaa tarpeetonta kokeilua. Samoin peräkkäisten antokertojen aika voidaan varmistaa ilman tarpeetonta kokeilua.

Esimerkkeinä keksinnön mukaisista koostumuksista voidaan mainita nestemäiset valmisteet aukon, esimerkiksi suun, nenän, peräaukon tai emättimen kautta tapahtuvaa tai suun sisäistä, mahan sisäistä, limakalvon (esim. kielen, hammaskuopan,

ikenen, hajuaistiin liittyvien tai hengityselimiin kuuluvien limakalvojen) läpi tapahtuvaa ja muulla vastaavalla tavalla tapahtuvaa antamista varten, kuten suspensiot, siirapit tai eliksiirit; sekä valmisteet, joita voidaan antaa ruuansulatuskanavan ulkopuolisesti, ihon alaisesti, ihon sisäisesti, lihaksen sisäisesti tai laskimon sisäisesti (esimerkiksi antaminen injektiona), esimerkiksi steriilit suspensiot tai emulsiot. Tällaisiin koostumuksiin on voitu sekoittaa sopivaa kantajaa, laimenninta tai täyteainetta kuten steriiliä vettä, fysiologista suolaliuosta, glukoosia tai muuta vastaavaa. Nämä koostumukset voidaan myös lyofilisoida. Nämä koostumukset voivat sisältää lisäaineita kuten kostuttavia tai emulgoivia aineita, pH-arvoa puskuroivia aineita, geeliä muodostavia tai viskositeettia parantavia lisäaineita, säilöntäaineita, flavoriaineita, väriaineita ja muita vastaavia, antamistavasta ja toivotusta valmisteesta riippuen. Apuna voidaan käyttää standardijulkaisuja kuten teosta "Remington's Pharmaceutical Science", 17. painos, 1985, joka sisällytetään oheen tällä viittauksella, sopivien valmisteiden valmistamiseksi ilman tarpeetonta kokeilua.

Keksinnön mukaiset koostumukset ovat tarkoituksenmukaisesti nestemäisiä valmisteita, esimerkiksi isotonisia vesipitoisia liuoksia, suspensioita, emulsioita tai viskooseja koostumuksia, jotka on voitu puskuroida valittuun pH-arvoon. Mikäli imeytyminen ruuansulatuskanavassa on toivottavaa, niin tällöin keksinnön mukaiset koostumukset voivat olla "kiinteässä" muodossa pinnoitettuina tabletteina, tabletteina, kapseleina, kapletteina ja vastaavina, mukaan lukien sellaiset "kiinteät" valmisteet, joista vapautuminen tapahtuu vähitellen tai joissa on nestemäinen täyte, esimerkkeinä gelatiinilla pinnoitettu neste, jolloin gelatiini liukenee mahassa suolistoon siirtymistä varten. Mikäli antaminen nenän tai hengityselinten kautta (limakalvojen läpi) on toivottavaa, niin tällöin koostumukset voivat olla muodossa, jota voidaan antaa sumutteena puristettavasta annostelijasta, pumppaavasta annostelijasta tai aerosolia tuottavasta annostelijasta. Aerosolit on tavallisesti paineistettu hiilivedyn avulla. Pumppaavat annostelijat voivat edullisesti annostella tietyn suuruisen annoksen tai annoksen, jossa hiukkasilla on tietty koko.

Keksinnön mukaiset koostumukset voivat sisältää farmaseuttisesti hyväksyttäviä flavoreita ja/tai väriaineita niiden saamiseksi miellyttävämpään muotoon, erityisesti

jos niitä annetaan suun kautta. Viskoosit koostumukset voivat olla geelejä, vesiä, juoksevia voiteita, voiteita ja muita vastaavia, ja ne sisältävät tyypillisesti riittävän määrän paksuntavaa ainetta siten, että niiden viskositeetti on noin 2500-6500 cps, vaikkakin käyttökelpoisia ovat myös koostumukset, joiden viskositeetti on suurempi, jopa 10 000 cps. Viskoosien koostumusten viskositeetti on edullisesti alueella 2500-500 cps, sillä tämän alueen yläpuolella niiden antaminen vaikeutuu. Kuitenkin tämän alueen yläpuolella koostumukset voivat olla kiinteitä tai gelatiinimaisia, jolloin niiden antaminen suun kautta on helppoa nielaistavana pinnoitettuna tablettina.

Nestemäisten valmisteiden valmistus on tavallisesti helpompaa kuin geelien, muiden viskoosien koostumusten ja kiinteiden koostumusten valmistus. Lisäksi nestemäisten koostumusten antaminen esimerkiksi injektiona tai suun kautta on hieman vaivattomampaa eläimille, lapsille, erityisesti pienille lapsille sekä muille sellaisille kohteille, joille pinnoitetun tabletin, tabletin, kapselin tai muun vastaavan nielaiseminen on vaikeata, tai useita annoksia annettaessa. Toisaalta viskoosit koostumukset voidaan valmistaa siten, että niiden viskositeetti saadaan sopivalle viskositeettialueelle valmisteen ja limakalvon, esimerkiksi mahapeitteen tai nenän limakalvon välisiin pitempiin kosketusaikoihin pääsemiseksi.

Ilmeistä on, että sopivien kantajien ja muiden lisäaineiden valinta riippuu erityisestä antamistavasta ja kyseessä olevan annostelumuodon kuten nestemäisen annostelumuodon luonteesta [esimerkiksi, onko koostumuksesta tarkoitus valmistaa liuos, suspensio, geeli tai muu nestemäinen muoto] tai kiinteän annostelumuodon luonteesta [esimerkiksi, onko koostumuksesta tarkoitus valmistaa pinnoitettu tabletti, tabletti, kapseli, kapletti, vähitellen vapauttava muoto tai nesteellä täytetty muoto].

Liuokset, suspensiot ja geelit sisältävät normaalisti suuren määrän vettä (edullisesti puhdistettua vettä) antigeenin, lipoproteiinin ja valinnaisen apuaineen lisäksi. Läsnä voi olla myös pieniä määriä muita aineosia kuten pH-arvon säätäjiä (esimerkiksi emästä kuten NaOH), emulgaattoreita tai dispergoivia aineita, puskuroivia aineita, säilöntäaineita, kostuttavia aineita, jähmettäviä aineita (esim. metyyliselluloosaa),

väriaineita ja/tai flavoreja. Koostumukset voivat olla isotonisia, eli niillä voi olla sama osmoottinen paine kuin verellä ja kyynelnesteellä.

Keksinnön mukaisten koosumusten toivottuun isotonisuuteen voidaan päästä käyttämällä natriumkloridia tai muita farmaseuttisesti hyvksyttäviä aineita kuten dekstroosia, boorihappoa, natriumtartraattia, propyleeniglykolia tai muita epäorgaanisia tai orgaanisia liuotteita. Natriumkloridi on edullista erityisesti natriumioneja sisältävien puskureiden tapauksessa.

Koostumusten viskositeetti voidaan pitää toivotulla tasolla käyttämällä farmaseuttisesti hyväksyttävää paksuntavaa ainetta. Metyyliselluloosa on edullista, koska sitä on saatavana vaivattomasti ja taloudellisesti ja koska sen käsittely on helppoa. Muista sopivista paksuntavista aineista voidaan mainita esimerkiksi ksantaanikumi, karboksimetyyliselluloosa, hydroksipropyyliselluloosa, karbomeeri ja muut vastaavat. Paksuntimen edullinen pitoisuus riippuu valitusta aineesta. Tärkeätä on käyttää sellaista määrää, jolla päästään valittuun viskositeettiin. Viskoosit koostumukset valmistetaan tvallisesti liuoksista lisäämällä tällaista paksuntavaa ainetta.

Farmaseuttisesti hyväksyttävää säilöntäainetta voidaan käyttää koostumusten varastoitavuuden parantamiseksi. Bentsyylialkoholi voi olla sopiva, monien muidenkin säilöntäaineiden kuten parabeenien, timerosaalin, klorobutanolin tai bentsalkoniumkloridin ollessa käyttökelpoisia. Säilöntäaineen sopiva pitoisuus on alueella 0,02—2 % kokonaispainosta laskien, vaikka tämä pitoisuus voikin vaihdella huomattavasti valitusta aineesta riippuen.

Alan asiantuntijalle on selvää, että koostumusten komponentit on valittava siten, että ne ovat kemiallisesti inerttejä PspA-antigeeniin ja valinnaiseen apuaineeseen nähden. Tämä ei ole mikään ongelma kemiallisia ja farmaseuttisia aineita tunteville henkilöille, tai ongelmat voidaan välttää helposti viittaamalla standarditeoksiin tai toteuttamalla yksinkertaisia kokeita (ilman tarpeetonta kokeilua) tämän julkaisun ja siinä siteerattujen asiakirjojen perusteella.

Tämän keksinnön mukaiset, immunologisesti vaikuttavat koostumukset valmistetaan sekoittamalla aineosat keskenään yleisesti hyväksyttyjä menettelytapoja noudattaen. Esimerkiksi, valitut komponentit voidaan yksinkertaisesti sekoittaa sekoittimessa tai muussa tavanomaisessa laitteessa väkevän seoksen saamiseksi, jonka seoksen pitoisuus ja viskositeetti voidaan sitten säätää lopullisiin arvoihin lisäämällä vettä tai paksuntavaa ainetta sekä mahdollisesti puskuria pH-arvon säätämiseksi tai muuta liuotetta tonisuuden säätämiseksi. Yleisesti, pH voi olla noin alueella 3—7,5. Näitä koostumuksia voidaan antaa lääketieteen ja eläinlääketieteen asiantuntijoille tunnettuina annoksina ja tekniikoilla ottaen huomioon sellaiset tekijät kuten kyseessä olevan potilaan tai eläimen ikä, sukupuoli, paino sekä tila ja annettava koostumusmuoto (esim. kiinteä tai nestemäinen muoto). Alan asiantuntija voi määrittää ihmisille ja muille nisäkkäille tarkoitetut annostukset ilman turhaa kokeilua tämän julkaisun, siinä siteerattujen asiakirjojen ja alla olevien esimerkkien (esimerkiksi hiiriä käyttäen toteutettujen esimerkkien) avulla.

Ensimmäisenä annettavan annoksen ja tehosteannosten tai myöhemmin annettavien annosten sopivat koot voivat myös vaihdella, ja sopivaa voi olla antaa ensimmäinen annos ja sen jälkeen myöhempiä annoksia; mutta alan asiantuntija kykenee kuitenkin määrittämään ne tämän julkaisun, siinä siteerattujen asiakirjojen ja alla olevien esimerkkien perusteella.

PCR-tekniikat näyte-DNA:n monistamiseksi diagnostista ilmaisua tai määritysmenetelmiä varten ovat tuttuja tekniikan nykytason perusteella tai ne tunnetaan ohessa mainittujen asiakirjojen (katso esimerkit) perusteella samoin kuin hybridisaatiotekniikat tällaisia menetelmiä varten. Edelleen, alan asiantuntija voi käyttää geenituotteita ja niistä saatuja vasta-aineita diagnostisissa, ilmaisu- ja määritysmenetelmissä alalla tunnetulla tavalla menettelemällä, ilman tarpeetonta kokeilua.

Seuraavat esimerkit on esitetty keksinnön havainnollistamiseksi, ei sen rajoittamiseksi.

ESIMERKIT

Esimerkki 1

Katkenneet *Streptococcus pneumoniae*:n PspA-molekyylit saavat aikaan ristisuojaavan immuniteetin pneumokokkialtistusta vastaan

Sen jälkeen, kun *S. pneumoniae* -eliö saatiin eristetyksi ihmisen syljestä vuonna 1881 ja kun se sitten kaksi vuotta myöhemmin osattiin yhdistää lohkokeuhkokuumeeseen, ihmisessä pneumokokki-infektioista johtuvat sairaudet ovat olleet hyvin yleisiä ja niihin on liittynyt merkittävää kuolleisuutta. Jokin aika sitten kehitysmaissa ja kehittyneessä maailmassa tehdyssä selvityksessä kiireellisesti tarvittavista rokotteista parannettu pneumokokkirokote sijoittui kolmen kipeimmin tarvittavan rokotteen joukkoon teollistuneissa maissa. Tällä hetkellä käytössä oleva rokote on pneumokokkimaisista kapselipolysakkarideista koostuva 23-arvoinen koostumus, joka tehoaa vain noin 60 prosentissa ikääntyneistä ihmisistä, ja jota ei suositella käytettäväksi alle kaksivuotiaissa lapsissa sen heikosta vaikutustehosta johtuen. Edelleen eristettyjen, monille lääkeaineille vastustuskykyisten *S. pneumoniae* -kantojen esiintymistiheyden suureneminen korostaa tehokkaamman rokotteen tarvetta pneumokokki-infektioiden estämiseksi.

Proteiinit ovat immunogeenisen luonteensa ansiosta pääasiallisia kohteita uusia rokotteita etsittäessä. Niistä pneumokokkimolekyyleistä, joita on tutkittu proteiinirokotteen mahdollisina ehdokkaina, voidaan mainita pneumolysiini, neuraminiidaasi, autolysiini ja PspA. Nämä kaikki proteiinit kykenevät tuottamaan immuniteetin hiirissä, minkä seurauksena elinikä pitenee ja aikaan saadaan suoja kuolemalta altistettaessa lähes LD_{50}-arvoa vastaaville annoksille. Näiden makromolekyylien joukossa PspA on ainutlaatuinen siinä suhteessa, että se voi saada aikaan eläimissä sellaisia vasta-aineita, jotka suojaavat LD_{50}-arvoon nähden 100 kertaa suurempia siirrosteita vastaan.

PspA on solupinnalla esillä oleva proteiini, jonka näennäinen molekyylipaino on 67-99 kDa, ja jota kaikki tähän saakka tutkitut, kliinisesti merkittävät *S. pneumoniae* -kannat ilmentävät. Vaikka eri pneumokokkikannoista peräisin olevat PspA-proteiinit ovatkin serologisesti erilaisia, niin kuitenkin monilla PspA-vasta-aineilla on ristireaktiivisuutta vieraista kannoista peräisin olevien PspA-proteiinien kanssa. Kun hiiret immunoidaan aktiivisesti PspA:lla, niissä kehittyy PspA-vasta-aineita, jotka suojaavat myöhemmältä altistumiselta erilaisille *S. pneumoniae* -kannoille. PspA:n immunogeenisten ja suojan tuottavien ominaisuuksien perusteella voidaan päätellä, että se saattaa olla hyvä ehdokasmolekyyli proteiinipohjaista pneumokokkirokotetta varten.

Neljä erillistä PspA-domeenia on tunnistettu DNA-sekvenssin perusteella. Ne ovat N-päätteen hyvin varautunut alfa-kierteinen alue, runsaasti proliinia sisältävä 82 aminohapon sekvenssi, C-päätteen toistolohko, joka koostuu kymmenestä 20 aminohapon toistuvasta sekvenssistä, sekä 17 aminohapon häntä. Joukko Rx1 PspA-proteiinia vastaan vaikuttavia monoklonaalisia vasta-aineita (MAb) on tuotettu ja sitoutumiskohta yhdeksässä tällaisessa MAb-vasta-aineessa on paikannettu jokin aika sitten alfa-kierteisen alueen Rx1 *pspA*-sekvenssissä. Viisi näistä Rx1 MAb-vasta-aineesta oli suojaavia hiirissä, jotka oli infektoitu virulentilla pneumokokkikannalla WU2. Neljä näistä viidestä suojaavasta vasta-aineesta kartoitettiin Rx1 PspA:n alfa-kierteisen domeenin kauimmaiseen kolmannekseen (aminohapot 192—260).

Pneumokokkikannasta Rx1 peräisin olevat katkenneet PspA-molekyylit, jotka sisälsivät aminohapot 192—588 tai 192—299, kloonattiin ja yhdistelmä-DNA -tekniset proteiinit ilmennettiin ja niiden kyky saada aikaan suoja myöhempää *S. pneumoniae* WU2 -altistusta vastaan määritettiin. Samoin kuin täysipituinen Rx1 PspA, kumpikin katkennut, etäisen alfa-kierteisen alueen sisältävä PspA suojasi hiiret kohtalokkaalta WU2 pneumokokki -infektiolta. Yhdistelmä-DNA -tekninen, aminohapot 192-588 käsittävä PspA-kappale oli kuitenkin immunogeenisempi kuin pienempi kappale, todennäköisesti sen suuremmasta koosta johtuen. Lisäksi Rx1-aminohappokappaleen 192—588 tuottama suoja oli verrattavissa täysipituisen Rx1 PspA-proteiinin tuottamaan suojaan. Tästä syystä muiden PspA-proteiinien ristisuojaavia epitooppeja etsittiin myös molekyylin siitä osasta, joka muodosti C-päätteen kaksi

kolmannesta. Kuten jäljempänä on tarkasteltu, Rx1-kannan aminohappojen 192—588 suhteen homologiset PspA-proteiinit monistettiin PCR-tekniikalla, ne kloonattiin ja ilmennettiin *E. coli*:ssa. Sitten kolmen, kapselityyppiä 4 ja 5 olevista kannoista peräisin olevan yhdistelmä-DNA -teknisen PspA:n kyky saada aikaan ristisuojaus eri kapselityyppiä olevilla kannoilla altistamista vastaan arvioitiin. Saadut tulokset osoittavat, että kapselityyppiä 4 ja 5 olevista kannoista peräisin olevat katkenneet PspA-proteiinit suojasivat yhdessä kapselityyppiä 4 ja 5 olevilla *S. pneumoniae* -lähtökannoilla sekä tyyppiä 3, 6A ja 6B olevilla *S. pneumoniae* -kannoilla altistamista vastaan tai tämän altistuksen aiheuttamalta varhaiselta kuolemalta.

Bakteerikannat ja viljelyolosuhteet

Kaikki pneumokokit olivat peräisin tämän laboratorion kantakokoelmasta ja ne on jo kuvattu (Yother, J. et al., Infect. Immun. 1982; 36: 184—188; Briles, D.E., et al., Infect. Immun. 1992; 60: 111—116; McDaniel, L.S., et al., Microb. Pathog. 1992; 13: 261—269; sekä McDaniel, L.S., et al., teoksessa: Ferretti, J.J. et al., toim. Genetics of streptococci, enterococci ja lactococci. 1995; 283—286), lukuun ottamatta kliinisiä eristeitä TJ0893, 0922134 ja BG8740. Pneumokokkikannat J0893 ja 0922134 saatiin vastaavasti erään 43-vuotiaan miehen sekä erään iäkkäämmän naisen verestä. *S. pneumoniae* BG8743 on eristetty 8 kuukauden ikäisen vauvan verestä. Tässä tutkimuksessa käytetyt kannat olivat kapselityypiä 3 (A66.3, EF10197, WU2), kapselityyppiä 4 (BG9739, EF3296, EF5668, L81905), kapselityyppiä 5 (DBL5), kapselityyppiä 6A (DBL6A, EF6796), kapselityyppiä 6B (BG7322, BG9163, DBL1), kapselityyppiä 14 (TJO893), kapselityyppiä 19 (BG8090) sekä kapselityyppiä 23 (0922134, BG8743). Lisäksi kantaa WG44.1, joka ei ilmennä lainkaan havaittavaa PspA-proteiinia, käytettiin PspA-spesifisessä vasta-aineanalyysissa. Kaikki kemikaalit hankittiin toimittajalta Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, mikäli toisin ei ole mainittu.

S. pneumoniae -eliötä kasvatettiin Todd Hewitt-elatusalustalla (Difco, Detroit, Michigan), jota oli täydennetty 5 %:lla hiivauutetta (Difco). Eksponentiaalisen kasvuvaiheen puolivälissä olevia viljelmiä käytettiin siirrosteina Lactated Ringer:in

alustaan (Abbott laboratories, North Chicago, Illinois) altistustutkimuksia varten. Altistustutkimuksissa käytettyjen pneumokokkikantojen tapauksessa siirrosteiden pitoisuudet olivat alueella 2,8—3,8 $\log_{10}$ CFU (pesäkettä muodostavaa yksikköä) (varmistettu laimennusmaljaamalla veriagarille). Maljoja inkuboitiin yön yli kynttilämaljassa (candle jar) 37 °C:ssa.

E. coli DH1- ja BL21 (DE3)-kantoja viljeltiin LB-alustassa [1 % Bacto-tryptoni (Difco), 0,5 % Bacto Yeast (Difco), 0,5 % NaCl, 0,1 % dekstroosia]. Soluhajotteiden valmistamiseksi yhdistelmä-DNA-teknistä *E. coli* -bakteeria kasvatettiin vähimmäis-E-alustassa, jota oli täydennetty tiamiinilla (0,05 M), glukoosilla (0,2 %), kasaminohapoilla (0,1 %; Difco) sekä kanamysiinillä (50 mg/ml). Bakteereiden pysyviä varastovijelmiä säilytettiin -80 °C:ssa kasvualustassa, joka sisälsi 10 % glyserolia.

Plasmidipohjaisten kantojen valmistus

Muodostetta pET-9a (Novagen, Madison, Wiskonsin) käytettiin seuraavista 14 *S. pneumoniae* -kannasta peräisin olevien katkenneiden *pspA*-geenien kloonaamiseksi: DBL5, DBL6A, WU2, BG9739, EF5668, L81905, 0922134, BG8090, BG8743, BG9163, DBL1, EF3296, EF6796 sekä EF10197 (taulukko 1). Viidestätoista kannasta peräisin olevat *pspA*-geenikappaleet monistettiin PCR-menetelmällä käyttäen kahta aluketta, jotka oli saatu laboratoriosta Connaugh Laboratories, Swiftwater, Pennsylvania.

Aluke N192: 5' GGAAGGCCATATGCTCAAAGAGATTGATGAGTCT 3' ja aluke C588: 5' CCAAGGATCCTTAAACCCATTCACCATTGGC 3' muodostettiin sisältämään NdeI- ja BamHI-restriktioendonukleaasikohdan, vastaavasti. PCR-monistetut geenituotteet pilkottiin entsyymeillä BamHI ja NdeI ja ligatoitiin lineariseksi tehtyyn ja samalla tvalla pilkottuun muodosteeseen pET-9a ja käsiteltiin edelleen bakteeriperäisellä alkalisella fosfataasilla, joka oli hankittu toimittajalta United States Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio, millä estettiin leikatun plasmidin sulkeutuminen uudestaan renkaaksi. Kloonit vakiinnutettiin ensin *E. coli*

BL21(DE3) -eliössä, joka sisälsi kromosomikopion T7 RNA-polymeraasigeenistä indusoituvan *lacUV5*-promoottorin säätelyn alaisuudessa.

E. coli DH1 -solut transformoitiin Hanahan:in menetelmällä (Hanahan, D.J., Mol. Biol. 1983; 166: 557—580). Pysyvät transformantit tunnistettiin seulomalla LB-kanamysiinimaljoilla. Kustakin kannasta eristetyt plasmidimuodosteet siirrettiin sähköisesti (Electro Cell Manipulator 600, BTX Electroporation System, San Diego, California) *E. coli* BL21(DE3) -soluihin ja kulloinkin saadusta kannasta käytetyt nimitykset on lueteltu taulukossa 1. Pelkkä pET-9a-vektori siirrettiin *E. coli* BL21(DES) -kantaan sähköisesti, jolloin saatiin kanta RCT125 (taulukko 2). Kaikki plasmidimuodosteet ja PCR-monistetut *pspA*-geenikappaleet arvioitiin elektroforeettisesti agaroosigeelillä (1 kb:n DNA-tikkaat, Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland). Seuraavaksi toteutettiin Southern-analyysi käyttäen muodostetta LM*pspA*1, joka on aikaisemmin kuvattu täysipituinen *pspA*-koetin (McDaniel, L.S. et al., Microb. Pathog. 1992; 13: 261—269), ja jossa on käytetty leimattua satunnaisaluketta digoksigeniini-11-dUTP (Genius System, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana). Hybridisaatio ilmaistiin kemiluminesenssiarkeilla valmistajan (Schleicher & Schuell, Keene, New Hampshire) ohjeiden mukaisesti.

Yhdistelmä-DNA-teknisten *E. coli*-kantojen solufraktiointi

Lukuisten, transformoidusta *E. coli* -eliöstä saatujen solufraktioiden kyky ilmentää katkenneita PspA-molekyylejä arvioitiin. Yksittäiset pesäkkeet siirrostettiin 3 ml:aan kanamysiiniä sisältäviä LB-viljelmiä ja kasvatettiin yön yli 37 °C:ssa. Seuraavaksi 80 ml:n suuruista LB-viljelmää, johon oli siirrostettu yön yli kasvanutta viljelmää suhteessa 1:100 laimennettuna, kasvatettiin 37 °C:ssa eksponentiaalisen kasvuvaiheen puoliväliin (A_{600} on noin 0,5) ja 1 ml:n suuruinen näyte otettiin talteen ja suspendoitiin uudestaan (indusoitumattomat solut) ennen indusointia isopropyylitiogalaktosidilla (IPTG, lopullinen pitoisuus 0,3 mM). Sen jälkeen, kun indusoinnista oli kulunut 1, 2 ja 3 tuntia, 0,5 ml soluja sentrifugoitiin, suspendoitiin uudestaan ja leimattiin indusoidut solut. Jäljellä oleva viljelmä jaettiin kahteen osaan, sentrifugoitiin (4000 x g, 10 min, DuPont Sorvall RC 5B Plus) ja supernatantti hylättiin. Yksi

kasauma suspendoitiin uudestaan 5 ml:aan liuosta, jonka koostumus oli 30 mM Tris-HCl, pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM (etyleenidinitrilo)-tetraetikkahapon dinatrium-suola (EDTA), ja pakastettiin -20 °C:ssa yön yli. Soluja sulatettiin 65 °C:n lämpötilassa 30 minuuttia, ne laitettiin jäihin ja niitä sonikoitiin viidellä 10 sekunnin pituisella sykäyksellä (suhteellinen teho 0,4, Fisher Sonic Dismembrator, Dynatech Laboratories, Inc. Chantilly, Virginia). Seuraavaksi materiaali sentrifugoitiin (9000 x g, 20 min.) ja supernatantista käytettiin nimitystä raakauute-sytoplasminen fraktio. Kasauma suspendoitiin uudestaan Tris-NaCl-EDTA -puskuriin ja liukenematon soluseinämä- ja solukalvofraktio leimattiin. Toinen jaetusta ja indusoidusta viljelmästä saatu kasauma suspendoitiin uudestaan 10 ml:aan 30 mM Tris-HCl -puskuria, pH 8,0, joka sisälsi 20 % sakkaroosia ja 1 mM EDTA, ja sitä inkuboitiin huoneen lämpötilassa 10 minuuttia samalla sekoittaen. Sitten solut sentrifugoitiin, supernatantti poistettiin ja kasauma suspendoitiin uudestaan 5 mM $MgSO_4$-liuosta (10 ml, 10 min., ravistelu 4 °C:n hauteessa). Tämä materiaali sentrifugoitiin ja supernatantista käytettiin nimitystä osmoottinen shokki-periplasminen fraktio. Solufraktiot arvioitiin SDS-PAGE-menetelmällä ja immunotäpläanalyysilla.

PspA:n MAb:t

PspA-spesifisiä monoklonaalisia vasta-aineita (MAb) XiR278 ja 1A4 käytettiin aikaisemmin kuvatulla tavalla (Crain, M.J. et al., 1990, Infect. Immun.; 58: 3293—3299). MAb P50-92D9 tuotettiin immunoimalla DBL5 PspA:lla. MAb P50-92D9:n PspA-spesifisyys varmistettiin Western-analyysilla, jolla todettiin sen reaktiivisuus *S. pneumoniae* -kannoista DBL5, BG9739, EF5668 ja L81095 peräisin olevien luonnollisten PspA-proteiinien kanssa ja kyvyttömyys tunnistaa PspA-vertailukanta WG44.1.

SDS-PAGE- ja immunotäpläanalyysi

E. coli -solufraktiot, jotka sisälsivät yhdistelmä-DNA-teknisiä PspA-proteiineja ja biotinyloituja molekyylipainojen merkkiaineita (pieni alue, BioRad, Richmond, Kalifornia), erotettiin natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidilla (10 %; Bethesda

Research Laboratories, Gaithersburg, Maryland) geeli-elektroforeettisesti (SDS-PAGE) Laemmli:n menetelmällä (Laemmli, U.K. Nature 1970; 227: 680—685). Näytteitä keitettiin ensin 5 minuuttia näytepuskurissa, joka sisälsi 60 mM Tris-puskuria pH 6,8, 1 % 2-B-merkaptoetanolia (Sigma, St. Louis, Missouri), 1 % SDS:ia, 10 % glyserolia ja 0,01 % bromifenolisinistä. Tämän jälkeen geelit siirrettiin (1 tunti, 100 volttia) nitroselluloosalle (0,45 mM huokoset, Millipore, Bedford, Massachusetts) Towbin:in et al. menetelmällä. Täplät salvattiin kaseiinilla (3 %), tuotteella Tween 20 (0,05 %) liuoksessa, joka sisälsi 10 mM Tris, 0,1 M NaC, pH 7,4 30 minuuttia ennen inkubointia PBST-liuokseen laimennettujen PspA-spesifisten monoklonaalisten vasta-aineiden kanssa 1 tunti 25 °C:ssa. Seuraavaksi täplä pestiin 3 kertaan PBST:lla ennen inkubointia alkalisella fosfatasilla laimetun vuohen anti-hiiri-immunoglobuliinin kanssa (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, Alabama) 1 tunnin ajan 25 °C:ssa. Huuhtelut toteutettiin kuten aikaisemmin ja täplät kehitettiin käyttäen 0,5 mg/ml 5-bromi-4-kloori-3-indolyylifosfaattia ja 0,01 % nitrosininen-tetratsoliumia (Sigma), joka oli ensin liuotettu 150 μl:aan dimetyylisulfoksidia ja laimennettu sitten 1,5 M Tris-HCL-puskuriin, pH 8,8. Pistetäplät (dot blot) analysoitiin samalla tavalla. Hajotenäytteistä (2 μl) muodostettiin pisteitä nitroselluloosasuodattimille (Millipore), annettiin kuivua, salvattiin ja ilmaistiin juuri kuvatulla tavalla.

<u>Yhdistelmä-DNA-teknisiä PspA-proteiineja sisältävien soluhajotteiden valmistus</u>

Transformoituja *E. coli* -kantoja RCT105, RCT113, RCT117 ja RCT125 (taulukko 2) kasvatettiin eksponentiaalisen kasvuvaiheen puoliväliin vähimmäis-E-alustassa ennen IPTG-indusointia (lopullinen pitoisuus 2 mM, 2 tuntia, 37 °C). Viljelmät otettiin talteen sentrifugoimalla (10 min. nopeudella 9000 x g), ne suspendoitiin uudestaan Tris-asetaattiin, pH 6,9 ja pakastettiin -80°C:ssa yön yli. Näytteitä sulatettiin 65 °C:ssa 30 minuuttia, jäähdytettiin jäissä ja sonikoitiin. Sitten näytteitä käsiteltiin 0,2 mM AEBSF:lla (Calbiochem, La Jolla, Kalifornia) 37 °C:ssa 30 minuuttia ja lopuksi ne sentrifugoitiin soluseinämä- ja solukalvokomponenttien poistamiseksi. Pistetäpläanalyysi toteutettiin käyttäen PspA-spesifisiä MAb-vasta-aineita yhdistelmä-DNA-teknisten, katkenneiden PspA-molekyylien läsnäolon

varmistamiseksi hajotteesta ennen niiden käyttämistä immunogeeneina hiirissä. Käyttämätöntä hajotemateriaalia säilytettiin -20 °C:ssa myöhempiä immunointeja varten.

Hiiren immunointi ja altistaminen

Suojaustutkimuksissa käytettiin 6—12 viikon ikäisiä CBA/CAHN-XID/J-hiiriä (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine). Nämä hiiret ovat X-sidonnaisesti immuunivajaita, mikä estää niitä tuottamasta vasta-ainetta polysakkaridikomponenteille, joten ne ovat äärimmäiset herkkiä pneumokokki-infektioille. Eläimet immunoitiin ihon alaisesti yhdistelmä-DNA -teknisten *E. coli* -kantojen RCT105, RCT113, RCT117 ja RCT125 soluhajotteilla (taulukko 2) täydellisessä Freund:in apuaineessa ensimmäisten imunointien tapauksessa. Toissijaiset injektiot annettiin epätäydellisessä apuaineessa ja myöhemmät tehosteet dH_2O:ssa. Immunoidut ja immunoimattomat hiiret (2—5 eläimen ryhmät) altistettiin *S. pneumoniae* -kannoille A66.3, BG7322, DBL6A, WU2, DBL5, BG9739 ja L81905 laskimon sisäisesti (häntälaskimo) pneumokokkiverenmyrkytyksen (sepsis) aiheuttamiseksi. Infektoituja eläimiä seurattiin 21 vuorokautta ja niitä hiiriä, jotka pysyivät elossa kolmen viikon pituisen arviointijakson ajan, pidettiin suojattuina kuolemalta ja niiden katsottiin pysyvän elossa 22 vuorokautta tilastollista analyysia varten. Elämän pitenemiseen johtava suoja laskettiin vertaamalla toisiinsa kuolemaan päättyvien vuorokausien keskimääräistä lukumäärää toisaalta imunoitujen hiirten tapauksessa ja toisaalta kaikkien vertailuhiirten tapauksessa (immunoimattomat ja RCT125-valeimmunoidut hiiret; yhteensä 6—7 eläintä).

Seerumin PspA-tasojen määrittäminen

Hiiristä otettiin verta silmämunan takaa toisten tehosteiden jälkeen ja jälleen ennen altistamista. Edustavat hiiritiitterit määritettiin entsyymiin kytkettyyn immunosorbenttiin perustuvalla määrityksellä (ELISA) käyttäen pneumokokkikannoista DBL5, BG9739 ja L81905 eristettyjä luonnollisia lähtö-PspA -proteiineja. PspA-proteiinit immobilisoitiin mikrotiitterilevyille inkuboimalla liuoksessa 0,5 $NaHCO_3$, 0,5 M

Na_2CO_3, pH 9,5, 4 °C:ssa yön yli. Alkalisella fosfataasilla leimattua vuohen anti-hiiri -immunoglobuliinia (Southern Biotechnology Associates, Inc.) käytettiin hiiren seerumivasta-aineiden ilmaisemiseen. Väri kehitettiin p-nitrofenyylifosfaatilla (Sigma, 1 mg/ml) 0,5 M $MgCl_2$-liuoksessa, pH 9,8, joka sisältää 10 % dietanoliamiinia, ja absorbanssi luettiin aallonpituudella 405 nm 30 minuutin pituisen inkuboinnin jälkeen. Tiittereiden käänteisluvut laskettiin vasta-aineen sinä laimennuksena, jolla optisen tiheyden arvoksi saatiin 0,1. Erityiseen immunogeeniryhmään kuuluvista yksittäisistä hiiristä peräisin olevat seerumit arvioitiin erikseen ja sitten vastaavat tiitterit neljästä hiirestä ryhmää kohden yhdistettiin tiitterialueen saamiseksi (taulukko 3).

Tilastolliset menetelmät

Yksiosaisen Fisher:in täsmätestin ja kahden näytteen järjestystestin avulla arvioitiin suoja kuolemaa vastaan sekä elämän piteneminen hiirimallissa.

Katkenneiden *pspA*-geenien kloonaaminen

Viidestätoista erilaisesta pneumokokkikannasta, jotka edustavat kahdeksaa erilaista kapselityyppiä (taulukko 1), peräisin olevat katkenneet *pspA*-geenit monistettiin PCR-menetelmällä käyttäen alukkeita N192 ja C588. Vaikka eri kannoista peräisin olevissa *pspA*-geeneissä esiintyykin vaihtelua, niin tämä tulos osoittaa kuitenkin, että eri *pspA*-geenit ovat riittävän samanlaisia sekvenssin monistamiseksi kaikissa tähän saakka tutkituissa kannoissa. PCR-monistus voitiin toteuttaa onnistuneesti kaikissa tutkituissa kapselityypeissä.

Neljätoista näistä monistetusta *pspA*-geenistä kloonattiin ja kolmea kloonia, jotka sisälsivät katkenneen PspA-molekyylin pneumokokkikannoista DBL5, BG9739 ja L81905, tutkittiin edelleen (taulukko 2). Muodosteiden varmistamiseksi yhdistelmä-DNA-teknisistä *E. coli* -kannoista [RCT105, RCT113, RCT117 ja RCT125) (taulukko 2)] peräisin olevat plasmidit eristettiin, pilkottiin restriktioendonukleaaseilla NdeI ja BamHI ja käsiteltiin elektroforeettisesti 1 % agaroosilla rinnan niiden vastaavissa

muodosteissa käytettyjen PCR-tuotteiden kanssa (kuvio 1A). Pilkkoutumisreaktio oli täydellinen muodosteen pRCT105:n tapauksessa, kun taas pRCT113- ja pRCT117-pilkkeet olivat epätäydellisiä (vastaavasti kaistat 5 ja 7). Tämä geeli denaturoitiin ja DNA siirrettiin nailonille Southern-analyysia varten. Kuvio 1B esittää vastaavaa Southern-täplää, jossa on käytetty koettimena täysipituista Rx1 *pspA* DNA:ta. Kaista 1 sisältää muodosteen pRCT125, pelkän pikotun vektorin, joka ei odotetusti reagoi pneumokokki-DNA-spesifisen koettimen kanssa. *PspA*-spesifinen koetin hybridisoituu PCT-tuotteiden ja pilkottujen plasmidi-istutteiden kanssa (katso nuoli, kuvio 1B9 sekä osittain pilkkoutumattomien muodosteiden pRCT113 ja pRCT117 kanssa (kaistat 5 ja 7), mikä vahvistaa DBL5, BG9739 ja L81905 *pspA* DNA:n onnistuneen kloonautumisen. Muodosteet varmistettiin samalla tavalla 11 muun yhdistelmä-DNA-teknisen kannan tapauksessa, jotka kannat sisälsivät erilaisia kapseli- ja PspA-tyyppejä edustavista *S. pneumoniae* -kannoista peräisin olevia katkenneita *pspA*-geenejä.

Yhdistelmä-DNA -teknisen PspA-proteiinin ilmentäminen *E. coli* B121(De3)-kannassa

Transformoituja *E. coli* -kantoja RCT105, RCT113, RCT117 ja RCT125 viljeltiin eksponentiaalisen kasvuvaiheen puoliväliin ennen IPTG:n lisäämistä kloonatun, katkenneen *pspA*-geenin ilmentymisen indusoimiseksi jokaisessa kannassa. Solun fraktiointikoe toteutettiin yhdistelmä-DNA -teknisten PspA-proteiinien paikantamiseksi transformoiduissa *E. coli* -kannoissa. Näytteet, jotka edustivat indusoitumattomia soluja, indusoituja soluja (1 tuntia, 2 tuntia ja 3 tuntia indusoinnista), periplasmista fraktiota, sytoplasmista fraktiota ja liukenematonta soluseinämä/solukalvomateriaalia, erotettiin SDS-PAGE -menetelmällä. Sitten proteiinit siirrettiin nitroselluloosalle ja Western-analyysi toteutettiin käyttäen PspA-epitoopeille spesifisiä monoklonaalisia vasta-aineita.

Kuvio 2 paljastaa, että sekä yhdistelmä-DNA -teknisestä kannasta RCT 105 peräisin oleva sytoplasminen fraktio (kaista 8) että liukenematonta materiaalia sisältävä fraktio (kaista 9) sisältävät arviolta 53,7 kDa:n suuruista proteiinia, jonka MAb XiR278 tunnistaa, ja jota ei esiinny indusoimatomassa solunäytteessä (kaista 3). Tämän

proteiinin määrä kasvaa suoraan verrannollisesti IPTG-induktion ajalliseen kestoon (kaistat 4-6; 1 tunti, 2 tuntia ja 3 tuntia, vastaavasti). Periplasmisessa fraktiossa ei esiintynyt lainkaan katkennutta RCT105 PspA:ta (kaista 7), mikä oli odotettavaa, koska pET-9a-vektorista puuttuu signaalisekvenssi, joka on välttämätön proteiinien ohjaamiseksi periplasmaan. Havaittu molekyylipaino (noin 53,5 kDa) on suurempi kuin 1,2 kb:n DBL5*pspA*-geenituotteelle ennustettu molekyylipaino (43,6 kDa; Kuvio 1A, kaista 4). Samoin kuin täysipituisen Rx1 PspA:nkin tapauksessa, katkenneille PspA-proteiineille havaitut ja ennustetut molekyylipainot eivät vastaa täysin toisiaan. Lisäksi immuunitäpläanalyysi toteutettiin yhdistelmä-DNA -teknisille *E. coli* -kannoille RCT113 ja RCT117 (käyttäen vastaavasti vasta-aineita MAb 1A4 ja P50-92D) ja samankaltaisia tuloksia saatiin, kun taas MAb XiR278 ei tunnistanut lainkaan vertailukannasta RCT125 peräisin olevia solufraktioita.

Yhdistelmä-DNA -teknisten, katkenneiden PspA-proteiinien suojaavan kyvyn arviointi

Kannoista RCT113, RCT117 ja RCT105 peräisin olevat katkenneet PspA-proteiinit ilmennettiin ja niiden kyky saada aikaan ristisuoja seitsemää erilaista *S. pneumoniae* -kantaa vastaan analysoitiin. Vertailuhiiret (joita ei oltu immunoitu tai jotka oli valeimmunoitu RCT125:llä) sekä yhdistelmä-DNA-teknisellä PspA-proteiinilla immunoidut hiiret altistettiin hiirelle virulenteilla kannoilla A66.3, BG7322, DBL6A, WU2, DBL5, BG9739 ja L81905. Taulukossa 3 on esitetty kunkin infektoidun hiiren kuolinpäivä.

Immunointi kannoista RCT113, RCT117 ja RCT105 peräisin olevalla katkenneella PspA-proteiinilla tuotti suojan kuolemaa vastaan niissä kaikissa hiirissä, jotka oli altistettu kapselityyppiä 3 olevilla kannoilla (A66.3 ja WU2 (taulukko 3). Nämä kolme katkennutta PspA:ta saivat samoin aikaan merkittävän suojan kuolemaa vastaan DBL6A- ja BG7322-pneumokokille altistettaessa (vastaavasti kapselityypit 6A ja 6B). Lisäksi immunointi yhdistelmä-DNA -teknisellä RCT113 PspA:lla lisäsi kannoille DBL5, BG9739 ja L81905 altistettujen hiirten kuolemaan johtavien vuorokausien määrää, kun taas RCT117 PspA pidensi hiirten, joihin oli siirrostettu

BG9739-pneumokokkia, elämää (taulukko 3). Katkennut BG9739 PspA sai aikaan suojan kaikkia tässä tutkimuksessa arvioituja altistavia kantoja vastaan (100 %), kun taas katkenneet yhdistelmä-DNA-tekniset L81905- ja DBL5 PspA:t tuottivat suojan kuolemaa vastaan 71 %:ssa ja 57 %:ssa altistamiseen käytetyistä *S. pneumoniae* -kannoista, vastaavasti.

Näiden kolmen immunogeenin tuottamat anti-PspA-vasta-ainetiitterit vaihtelevat arviolta 10-kertaisella alueella (taulukko 3). RCT105 tuotti pienimmät vasta-ainepitoisuudet ja tämä katkennut PspA sai myös aikaan suojan altistavien kantojen pienintä lukumäärää vastaan. RCT13 ja RCT117 tuottivat kolme ja yhdeksän kertaa enemmän anti-PspA-vasta-ainetta, vastaavasti. Odotetusti, immunoimattomissa hiirissä ei todettu lainkaan PspA:ta vastaan vaikuttavaa vasta-ainetta eikä spesifistä PspA-vasta-ainetta voitu mitata hiiristä, jotka oli immunoitu vain vektorin käsittävällä vertailukannalla (RCT125).

Yhteenvetona, immunointi RCT113 ja RCT117 PspA:lla suojasi hiiret kohtalokasta, kapselityyppiä 3 ja 6A olevilla kannoilla toteutettua altistusta vastaan ja pidensi niiden hiirten, joihin oli siirrostettu tyyppiä 4, 5 ja 6B olevia pneumokokkeja, elämää. RCT105 PspA -immunointi suojasi kapselityyppiä 3 ja 6B olevilla kannoilla aiheutetulta kohtalokkaalta infektiolta ja pidensi kuolemaa edeltävää aikaa tyyppiä 6A olevan *S. pneumoniae*:n tapauksessa, mutta se ei tuottanut suojaa tyyppiä 4 ja 5 olevia kantoja vastaan. Nämä tiedot osoittavat, että kapselityyppiä 4 ja 5 olevista pneumokokeista peräisin olevat katkenneet PspA:t suojasivat yleisesti hiiriä ja siis muita isäntiä kuten ihmisiä kutakin seitsemää altistavaa kantaa tai niiden aiheuttamaa kuolemaa vastaan. Kuitenkin yleisesti suoja kapselityyppiä 3, 6A ja 6B olevia kantoja vastaan todettiin täydellisemmäksi tyyppiä 4 ja 5 oleviin *S. pneumonia* -kantoihin verrattuna.

PspA on todettu *S. pneumoniae* -eliön suojan tuottavaksi molekyyliksi. Samoin on todettu, että immunointi PspA:lla on ristisuojaava, vaikka sen tuottama suoja onkin täydellisempi tiettyjä kantoja vastaan muihin verrattuna. Näin ollen on mahdollista, että laajasti suojaavan PspA-rokotteen täytyy sisältää PspA-proteiineja useammasta

kuin yhdestä pneumokokkikannasta. PspA:n alfa-kierteisen alueen etäinen kolmannes on tunnistettu PspA:n pääasialliseksi suojaavaksi alueeksi. Lisäksi tämä alue on esillä hyvin antigeenisessa muodossa, kun se on ilmentynyt molekyylin ehjässä C-päätteen puolessa. Tässä esimerkissä osoitetaan mahdolliseksi käyttää katkenneita PspA-proteiineja, jotka ovat homologisia aminohappojäännöksestä 192 jäännöksen 588 kohdalla sijaitsevaan C-päätteeseen saakka ulottuvan Rx1 PspA:n alueen suhteen.

PspA:n C-päätteen kaksi kolmannesta kloonattiin neljästätoista kannasta PCR-monistamalla kooltaan sopiva (1,2 kb) geenikappale, joka hybridisoitui täysipituiseen Rx1 *pspA*-sekvenssiin. PCR-monistaminen toteutettiin onnistuneesti kaikissa analysoiduissa kapselityypeissä. Näin ollen PspA:n C-päätteen kaksi kolmannesta voidaan monistaa useista, ellei peräti kaikista pneumokokin kapselityypeistä Rx1 *pspA*-spesifisillä alukkeilla. Niinpä tätä tekniikkaa voidaan käyttää monia PspA-proteiineja tai niiden kappaleita sisältävien antigeenisten tai immunologisten koostumusten tai rokotekoostumusten kehittämiseksi.

Näistä klooneista kolme katkennutta PspA-proteiinia ilmennettiin ja arvioitiin hiiren immunointiin perustuvissa tutkimuksissa, joilla pyrittiin selvittämään niiden kyky tuottaa ristisuoja pneumokokkien erilaisilla kapselityypeillä altistamista vastaan. Kaikki kolme yhdistelmä-DNA -teknistä PspA:ta tuottivat vasta-ainetta, joka oli reaktiivista kulloinkin vastaavan luovuttaja-PspA:n kanssa ja kaikki kolme tuottivat suojan pneumokokki-infektiota vastaan. Niistä kahdesta katkenneesta PspA-proteiinista, jotka tuottivat suurimmat vasta-ainevasteet, 100 % ja 71 % altistavista kannoista oli suojattu. RCT105 PspA, joka tuotti PspA-spesifisen vasta-aineen pienimmät tiitterit, sai aikaan suojan arvioituja *S. pneumoniae* -kantoja vastaan 57 %:ssa tapauksista. Kaikkien katkenneiden PspA-proteiinien tapauksessa merkittävä suojaus todettiin neljässä näistä seitsemästä altistavasta kannasta. Itse asiassa kaikissa tapauksissa, yhtä lukuunottamatta (RCT105-immunoidut hiiret, jotka altistettiin kannalle BG9739), suuntauksena oli immunointi katkenneella PspA:lla suojan aikaansaamiseksi pneumokokkialtistusta vastaan. Nämä tulokset osoittavat, että katkennut Rx1 PspA (aminohapot 192—588) ristisuojaavat hiiriä kohtalokkaalta *S. pneumoniae* WU2 -altistukselta. Edelleen merkittävällä tavalla näistä tuloksista

nähdään, että eri PspA-proteiinien homologisilla alueilla todetaan toisiinsa verrattavia ristisuojaavia ominaisuuksia.

Suojan tuottaminen kapselityyppiä 4 ja 5 olevia kantoja vastaan oli vaikeampaa kuin tyyppiä 3, 6A ja 6B olevia pneumokokkikantoja vastaan. PspA-proteiinien serologiset erot saattavat vaikuttaa eräissä tapauksissa ristisuojaan. Kuitenkaan vaikeutta saada aikaan suoja ohessä käytettyjä, tyyppiä 4 ja 5 olevia kantoja vastaan ei voida selittää tällä tavalla, sillä katkenneet PspA-immunogeenit kloonattiin samoista kolmesta altistamiseen käytetystä, tyyppiä 4 ja 5 olevasta kannasta. Kumpikin PspA tyyppiä 4 olevista kannoista viivästytti yhden tai kummankin, tyyppiä 4 olevan altistavan kannan aiheuttamaa kuolemaa, mutta kumpikaan niistä ei kyennyt estämään kummankaan tyyppiä 4 olevan pneumokokkikannan aiheuttamaa kuolemaa. Lisäksi tyyppiä 5 olevasta DBL5-kannasta peräisin oleva katkennut PspA sai aikaan suojan kuolemaa vastaan tai viivästytti kuolemaa kapselityyppiä 3, 6A ja 6B olevien kantojen tapauksessa, mutta ei kyennyt suojaamaan infektiolta luovuttajakantansa eikä kummankaan tyyppiä 4 olevan altistavan kannan tapauksessa.

Useita syitä saattaa olla siihen, miksi kapselityyppiä 4 tai 5 olevista kannoista peräisin olevat katkenneet PspA-proteiinit eivät kyenneet suojaamaan kuolemalta edes silloin, kun kysymyksessä olivat niiden homologiset luovuttaja-*S. pneumoniae* -kannat. Eräs mahdollisuus on se, että tutkimukseen valitut, tyyppiä 4 ja 5 olevat kannat ovat erityisen virulentteja XID-hiirimallissa. XID-hiirissä ei kehity vasta-aineita polysakkarideille ja tästä syystä ne ovat äärimmäisen alttiita pneumokokkiinfektiolle, vähemmän kuin 100 CFU ollessa riittävä määrä useimpien kantojen tapauksessa, kapselityyppiä 3, 4, 5, 6A ja 6B olevat kannat mukaan lukien. Tyyppiä 4 ja 5 olevien kantojen voimistunut virulenttisuus hiirissä on ilmeistä sen tosiseikan perusteella, että immunologisesti normaaleissa hiirissä näillä kannoilla on pienemmät LD_{50}-arvot ja/tai ne ovat yleisemmin kohtalokkaita kuin kapselityyppiä 3, 6A tai 6B olevat kannat.

Eräs muu mahdollisuus on se, ettei kapselityyppiä 4 ja 5 olevia kantoja torjuvan suojan aikaansaavalle kyvylle kriittisiä epitooppeja ole läsnä PspA:n C-päätteen kaksi

kolmannesta muodostavassa osassa (aminohapot 192-588) eli immunointiin käytetyissä katkenneissa kappaleissa. Näiden kantojen tapauksessa kriittiset epitoopit saattavat sijaita niiden PspA-molekyyleissä alfa-kierteisen alueen N-päätteen kaksi kolmannesta muodostavassa osassa. Lopuksi, mahdollista on myös se, että PspA saattaa olla huonommin paljaana toisissa *S. pneumoniae* -kannoissa kuin toisissa. Kannan Rx1 PspA-aminohapposekvenssi ei sisällä Schneewind:in et al. kuvaamaa, useissa gram-positiivisissa bakteereissa esiintyvää soluseinämän kiinnittymisyksikköä LPXTGX. Sen sijaan PspA:ssa on uusi ankkuroitumismekanismi, jota välittävät pneumokokin kalvosidonnaisen lipoteikoiinihapon ja molekyylin C-päätteessä sijaitsevan toistuvan alueen väliset koliinivuorovaikutukset. Elektroniseen mikrovalokuvaukseen perustuva tutkimus on varmistanut PspA:n sijoittumisen pneumokokin pinnalle ja PspA-spesifisillä MAb-vasta-aineilla saadut tulokset osoittavat pääsyn pinnalla paljaana oleviin PspA-proteiineihin. Tunnettua ei ole kuitenkaan se, eroavatko *S. pneumoniae* -kannat olennaisesti toisistaan sen suhteen, miten hyvin eri PspA-alueet ovat paljaana ympäristöön nähden. Tunnettua ei ole myöskään se, onko bakteerisolun pinnalla ilmentyneen PspA:n määrä hyvin erilainen kantojen välillä.

Taulukko 1 Pneumokokin kapselityypin mukaan luokitellut yhdistelmä-DNA-tekniset pspA-kannat

Kapselityyppi	Lähtökanta	Vastaava yhdistelmä-DNA -tekninen kanta
3	WU2, EF10197	RCT111, RCT137
4	BG9739, EF5668	RCT113, RCT115
	L81905, EF3296	RCT117, RCT133
5	DBL5	RCT105
6A	DBL6A, EF6796	RCT109, RCT135
6B	BG9163, DBL1	RCT129, RCT131
14	TJO893*	ei yhtään*
19	BG8090	RCT121
23	0922134, BG8743	RCT119, RCT123

* Jokin aika sitten monistettu, toistaiseksi kloonaamaton katkennut pspA

Taulukko 2 Yhdistelmä-DNA-teknisten kantojen, joiden avulla arvioitiin hiirissä katkenneilla PspA-proteiineilla oleva, suojan aikaansaava kyky, kuvaus

Yhdistelmä-DNA -tekninen kanta	Kuvaus	Lähtö-PspA:n kapselityyppi
RCT 105	BL21 (DE3) E.coli + pET-9a:DBL5	5
RCT 113	BL21 (DE3) E.coli + pET-9a:BG9739	4
RCT 117	BL21 (DE3) E.coli + pET-9a:L81905	4
RCT 125	BL21 (DE3) E.coli + pET-9a (pelkkä vektori)	

Taulukko 3 Katkenneilla *S. pneumoniae* PspA-molekyyleillä aikaansaadun suojan arviointi hiirissä vuorokausina ennen kuolemaa altistamisen jälkeen*

		Altistava kanta [kapselityyppi] log_{10} (annos yksikössä CFU) (pesäkkeitä muodostavat yksiköt)						
Immunoiva yhdistelmä-DNA-teknin-nen PspA/PspA:n luovuttajakanta	Anti-PspA-tiitterin käänteisluku*	A66.3 [tyyppi 3] (2,78)	WU2 [tyyppi 3] (3,57)	DBL6A [tyyppi 6A] (3,24)	BG7322 [tyyppi 6B] (3,11)	DLB5 [tyyppi 5] (3,81)	BG9739 [tyyppi 4] (3,56)	LB1905 [tyyppi 4] (3,62)
RCT1113/BG9739	5590-50.300	4x>21*	4x>21§	15,3x>21‡	12,13,16>21‡	3,3,4,5†	5,5,7†	5,6,8,8†
RCT1117/LB1905	5590-150.900	4x>21*	4x>21§	7,16,2x>21†	10,12,13,>21†	3,3,4,4¶	4,5,13,>21†	3,4,6,8
RCT105/DBL5	1800-16.770	4x>21*	4x>21§	8,10,13,21‡	4x>21‡	2,2,2,>21	2,2,2,4	4,5,5,5
RCT125/ pelkkä vektori	20-620	3,6,6,>21	2,3,4,>21	3,6,6,6	7,8,8,14	2,2,2,2	2,2,3,4,5	2,3,5,5
puuttuu	0	2,2,2	2,3	3,3,4	6,7,9	2,5	3,5	2,5

* Kolmen viikon pituisen arviointijakson jälkeen hengissä olleet eläimet tapettiin ja kuolemaa edeltävien vuorokausien lukumääräksi merkittiin >21 vuorokautta.
, Tilastollista analyysia varten P-arvot laskettiin 22. vuorokautena näiden täydellisesti suojattujen hiirten tapauksessa.
†, Neljällä seerumilla saatu alue hiiriryhmää kohden; tiitterit on mitattu luonnollisia luovuttaja-PspA-proteiineja vastaan.
‡ P< 0,012
§ P< 0,035
¶ P< 0,057
Huom: Tilastolliseen analyysiin käytettiin yksiosaista Fisher:in täsmätestiä ja kahden näytteen järjestystestiä.

Esimerkki 2 Suojan aikaansaavien *S. pneumoniae* -epitooppien ja PspA:n paikantaminen

Tässä esimerkissä osoitetaan kahdessa PspA-kappaleessa (aminohapot 192—588 ja 192—299) olevien PspA-epitooppien kyky tuottaa ristisuoja erilaisten pneumokokkien joukkoa vastaan. Tässä esimerkissä tunnistetaan samoin alueet, jotka ovat homologiset Rx1-aminohappoihin 192—299 nähden 15 muusta erilaisesta pneumokokkikannasta. Sitten näitä alueita koodaava DNA monistettiin ja kloonattiin. Ilmennettyjen yhdistelmä-DNA -teknisten PspA-kappaleiden kyky saada aikaan ristisuoja erilaisia virulentteja pneumokokkeja vastaan arvioitiin.

Bakteerikannat ja elatusalustat:

S. pneumoniae -kantoja kasvatettiin Todd Hewitt-alustalla, joka sisälsi 0,5 % hiivauutetta (THY) (molemmat saatu toimittajalta Difco Laboratories, Detroit, Michigan) 37 °C:ssa tai veriagarmaljoilla, jotka sisälsivät 3 % lampaan verta, 37 °C:ssa ja alennetussa happipaineessa. *E. coli* -kantoja kasvatettiin Luria-Bertani -alustassa tai vähimmäis-E-alustassa. Bakteereita säilytettiin -80 °C:ssa elatusalustassa, jota oli täydennetty 10 %:lla glyserolia. *E. coli*-bakteerit transformoitiin Hanahan:in menetelmillä (Hanahan, D.J., Mol. Biol. 1983; 166: 557). Ampisilliinia (Ap) käytettiin 100 μg/ml olevana pitoisuutena *E. coli* -bakteereiden tapauksessa.

pIN-III-ompA3- ja pMAL-pohjaisten *E. coli* -kantojen muodostaminen:

Yhdistelmä-DNA -tekniset plasmidit pBC100 ja pBAR416, jotka ilmentävät ja erittävät *E. coli*:sta peräisin olevia *pspA*-kappaleita, muodostettiin käyttäen muodostetta pIN-III-ompA3, kuten aikaisemmin on kuvattu (McDaniel, L.S. et al., Microb. Pathog. 1994; 17: 323).

pMAL-p2 -vektoria (New England Biolabs, Protein Fusion & Purification System, luettelono. 800) käytettiin kannasta Rx1 ja seitsemästä muusta *S. pneumoniae* -kannasta eli R36A, D39, A66, BF9739, DBL5, DBL6A ja LM100, peräisin olevien

pspA-geenikappaleiden kloonaamiseksi aminohapoiksi 192-299. Näiden *pspA*-geenikappaleiden monistaminen toteutettiin polymeraasin ketjureaktiolla (PCR) aikaisemmin kuvatulla tavalla (McDaniel, L.S. et al., Microb. Pathog. 1994; 17: 323) käyttäen alukkeita

5' CCGGATCCGCTCAAAGAGATTGATGAGTCTG 3' [LSM4] ja

5' CTGAGTCGACTGAGTTTCTGGAGCTGGAGC 3' [LSM6], jotka oli muodostettu siten, että niissä oli BamHI- ja SalI-restriktioendonukleaasikohta, vastaavasti. Alukkeet perustuivat Rx1 PspA-sekvenssiin. PCR-tuotteet ja pMAL-vektori pilkottiin entsyymeillä BamHI ja SalI ja ligatoitiin yhteen. Kloonit transformoitiin *E. coli* DH5α -kantaan Hanahan:in menetelmillä. Pysyvät transformantit valikoitiin LB-maljoilla, jotka sisälsivät 100 μg/ml Ap:ta. Nämä kloonit seulottiin LB-maljoilla, jotka sisälsivät 0,1 mM IPTG, 80 μg/ml X-gal ja 100 μg/ml Ap ja kopio-LB -maljoilla, jotka sisälsivät 100 μg/ml Ap valmistajan ohjeiden mukaisesti. Kantojen nimitykset näiden muodosteiden tapauksessa on lueteltu taulukossa 6. Positiivisista klooneista arvioitiin oikea *pspA*-geenikappale elektroforeettisesti agaroosigeelillä plasmidieristyksen jälkeen Birnboim:in ja Doly:n menetelmillä (Birnboim, H.C. et al., Nucl. Acids Res. 1979, 7: 1513). Southern-analyysi toteutettiin aikaisemmin kuvatulla tavalla käyttäen täysipituista *pspA*-koetinta (McDaniel, L.S. et al., Microb. Pathog. 1994; 17: 323), jossa on käytetty leimattua satunnaisaluketta digoksigeniini-11-dUTP (Genius System, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana), ja ilmaistiin kemiluminesenssilla.

<u>Yhdistelmä-DNA-teknisten PspA-proteiinikappaleiden ilmentäminen</u>

Kantojen BC100 ja BAR416 tapauksessa ilmentämisen herättämiseksi bakteereita kasvatettiin niin kauan, että optiseksi tiheydeksi aallonpituudella 660 nm saatiin arviolta 0,6 37 °C:n lämpötilassa vähimmäisalustalla ja IPTG:tä lisättiin 2 mM olevaksi lopulliseksi pitoisuudeksi. Soluja inkuboitiin vielä 2 tuntia 37 °C:ssa, ne otettiin talteen ja periplasminen sisältö vapautettiin osmoottisella shokilla. Kantojen BAR36A, BAR39, BAR66, BAR5668, BAR9739, BARL5, BAR6A ja BAR100 tapauksessa bakteereita kasvatettiin ja herättäminen toteutettiin edellä kuvatulla tavalla, paitsi että viljelyalustana käytettiin LB-alustaa + 10 mM glukoosia. Näistä

kannoista saadut proteiinit puhdistettiin amyloosihartsipylväällä valmistajan ohjeiden mukaisesti (New England Biolabs, Protein Fusion & Purification System, luettelonumero 800). Lyhyesti, amyloosihartsi kaadettiin 10 ml:n pylvääseen ja pestiin pylväspuskurilla. Laimennettua, osmoottisella shokilla saatua uutetta kaadettiin noin 1 ml/min olevalla virtausnopeudella. Sitten pylväs huuhdottiin jälleen pylväspuskurilla ja fuusioproteiini eluoitiin pylväästä pylväspuskurilla, joka sisälsi 10 mM maltoosia. Hajotteita varastoitiin -20 °C:ssa käyttöön saakka.

Immunointiin käytettyjen katkenneiden PspA-proteiinien tunnusomaiset piirteet

Katkenneet PspA-molekyylit, vertailut ja molekyylipainon merkkiaineet (BioRad, Richmond, CA) käsiteltiin elektroforeettisesti 10 % natriumdodekyylisulfaattia (SDS) käsittävillä polyakryyliamidigeelillä ja täpliä muodostettiin sähköisesti nitroselluloosalle. Kaniinin polyklonaalista anti-PspA-seerumia ja kaniinin antimaltoosisitoutumisproteiinia käytettiin primaarivasta-aineina täplien varustamiseksi koettimella.

Suoraan sitovaa ELISA-menettelyä käytettiin immunotäplien avulla todettujen reaktiivisuuksien varmistamiseksi. Kaikkien proteiiniuutteiden tapauksessa osmoottisella shokilla aikaansaadut valmisteet laimennettiin 3 μg/ml olevaksi pitoisuudeksi fosfaatilla puskuroituun suolaliuokseen (PBS) ja 100 μl lisättiin Immulon 4-mikrotiitterilevyjen (Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA) kuoppiin. Sen jälkeen, kun salpaaminen oli toteutettu 1,5 % naudan seerumin albumiinilla PBS-liuoksessa, yksittäisten MAb-vasta-aineiden fraktioimattomat kudosviljelmän supernatantit titrattiin kahteen kertaan käyttäen kolminkertaista laimennussarjaa seitsemässä kuopassa ja kehitettiin käyttäen sekundaarisena vasta-aineena alkalisella fosfataasilla leimattua vuohen anti-hiiri immunoglobuliinia (Southern Biotech Associates, Birmingham, AL) ja alkalisen fosfataasin substraattia (Sigma, St. Louis, MO). Levyt luettiin aallonpituudella 405 nm Dynatech-levynlukijalla 25 minuutin kuluttua ja 30 % loppupiste laskettiin kullekin vasta-aineelle jokaisesta valmisteesta.

Immunisointi- ja suojamääritykset

Kuuden-yhdeksän viikon ikäisiä CBA/CAHN-XID/J (CBA/N) -hiiriä saatiin laboratoriosta Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine. CBA/N-hiiret kantavat X-sidonnaista immuunivajauspiirrettä, jonka seurauksena ne eivät juurikaan kykene tuottamaan vastetta polysakkaridiantigeeneille, mutta niissä syntyy normaaleina vasta-ainepitoisuuksina ilmenevä vaste proteiiniantigeeneja vastaan. Nämä hiiret ovat hyvin alttiita pneumokokki-infektioille, koska niiden seerumista puuttuvat C-polysakkaridin fosfokoliinideterminantin kanssa reaktiiviset vasta-aineet. BC100-kappaleella immunoitujen hiirten nivustaipeeseen injektoitiin CFA-apuaineeseen emulgoitua antigeenia siten, että hiirtä kohden saatiin suurin piirtein 3 μg:n suuruinen proteiiniannos. Neljätoista vuorokautta myöhemmin hiiret saivat tehosteena, vatsaontelon sisäisesti 3 μg antigeenia laimennettuna Ringer's lactate -liuokseen ilman apuainetta. Vertailuhiiret immunoitiin samalla tavalla menettelemällä, käyttäen laimenninta ja apuainetta, ei kuitenkaan antigeenia. BAR416-kappaleella immunoituihin hiiriin injektoitiin 0,2 ml CFA-apuaineeseen emulgoitua antigeenia kahteen kohtaan kielen alle. Hiirille annettiin tehosteena nivustaipeeseen neljätoista vuorokautta myöhemmin IFA-apuaineeseen emulgoitua antigeenia ja niille annettiin toisena tehosteena neljätoista vuorokautta myöhemmin vatsaontelon sisäisesti 0,2 ml antigeenia laimennettuna Ringer's lactate -liuokseen ilman apuainetta.

Hiiret, jotka oli immunoitu Rx1 BAR416-homologeilla, immunoitiin edellä kuvatulla tavalla. Vertailueläinten tapauksessa käytettiin samaa immunointimenettelyä, mutta niille annettiin immunointia varten maltoosia sitovaa proteiinia (MBP) CFA-apuaineeseen suhteessa 1:1 laimennettuna, ja myös ne saivat tehosteena MBP-proteiinia.

Seerumianalyysi

Hiiristä otettiin verta silmämunan takaa käyttäen 75 μl heparinisoitua mikrohematokriittista kapillaariputkea (Fisher Scientific) ennen ensimmäistä immuointia ja sitten suunnilleen kerran kahdessa tunnissa ennen altistamista virulenteille pneumokokeille. Seerumista analysoitiin PspA-vasta-aineiden läsnäolo entsyymiin kytkettyyn im-

munosorbenttiin perustuvalla määrityksellä (ELISA) käyttäen pinnoittavana antigeenina luonnollisessa muodossa olevaa täysipituista R36A PspA:ta aikaisemmin kuvatulla tavalla (McDaniel, L.S. Microb. Pathog. 1994; 17: 323).

Hiirten infektoiminen laskimon sisäisesti

Pneumokokkiviljelmät kasvatettiin myöhäiseen log-vaiheeseen THY-alustassa. Pneumokokit laimennettiin pitoisuuteen 10^4 CFU laktatoidulla Ringer:in liuoksella, aallonpituudella 420 nm määritetyn optisen tiheyden perusteella. Seitsemän vuorokautta viimeisen tehosteinjektion jälkeen kussakin ryhmässä laimennettuja pneumokokkeja injektoitiin laskimon sisäisesti (häntälaskimo) 0,2 ml olevana tilavuutena ja maljattiin veriagarmaljoille, jotta saataisiin selville CFU-lukumäärä millilitraa kohden. Lopullinen altistava annos oli suurin piirtein 50-100 -kertainen kunkin taulukoissa 4—6 luetellun pneumokokkikannan LD_{50}-annokseen nähden. Hiirien hengissäpysymistä seurattiin 21 vuorokautta. Vielä näiden 21 vuorokauden kuluttua hengissä olevien eläinten katsottiin selviytyneen altistuksesta.

Tilastollinen analyysi

Kuolemaa edeltävien vuorokausien erilaisen lukumäärän tilastollinen merkitys laskettiin Wilcoxon:in kahden näytteen järjestystestillä. Hengissäpysymisen tilastollinen merkitys kuolemaan nähden määritettiin käyttäen Fisher:in täsmätestiä. Kussakin tapauksessa PspA:ta sisältävillä valmisteilla immunoiduista hiiristä muodostettuja ryhmiä verrattiin immunoimattomiin vertailuihin tai sellaisiin vertailuihin, jotka oli immunoitu PspA:ta sisältämättömillä valmisteilla. Yksiosaista laskentaa käytettiin kaksiosaisen laskennan sijasta, sillä koskaan ei olla todettu, että immunointi PspA:lla tai PspA:n kappaleilla heikentäisi tilastollisesti merkittävällä tavalla kykyä vastustaa infektiota.

Kloonaaminen pMAL-vektoriin

Rx1 PspA-, LSM4- ja LSM6-sekvenssiin perustuvia alukkeita käyttäen *pspA*-geenikappaleita monistettiin PCR-tekniikalla viidentoista tutkittavan pneumokokkikannan joukosta valituista 15 kannasta. Yhdestätoista geenikappaleesta 7 kloonattiin muodosteeseen pMAL-p2 ja transformoitiin *E. coli* -eliöön (Taulukko 6). Jokaisen uuden kloonin tapauksessa asianmukainen istutus varmistettiin elektroforeettisesti agaroosigeelillä ja Southern:in hybridisaatioanalyysilla. Yhdistelmä-DNA-teknisistä *E. coli* -kannoista BAR36A, BAR39, BAR66, BAR9739, BARL5, BAR6A ja BAR100 peräisin olevat plasmidit eristettiin, pilkottiin restriktioendonukleaaseilla BamHI ja SalI ja käsiteltiin elektroforeettisesti 0,7 % TBE-agaroosigeelillä. Sitten tämä geeli denaturoitiin ja DNA siirrettiin nailonkalvolle Southern-hybridisaatiota varten. Täplään liitettiin koettimeksi täysipituinen Rx1 *pspA* DNA hyvin ehdottomissa (high stringency) olosuhteissa. R36A, D39, A66, BG9739, DBL5, DBL6A ja LM100 *pspA* DNA:n kloonautuminen muodosteeseen pMal-p2 varmistettiin RX1-koettimen kykynä tunnistaa kaikki entsyymeillä BamHI ja SalI pilkotut DNA-istutteet.

Katkenneiden yhdistelmä-DNA -teknisten proteiinien ilmentäminen ja varmistus

Transformoituja *E. coli* -kantoja BAR36A, BAR39, BAR66, BAR9739, BARL5, BAR6A ja BAR100 kasvatettiin LB-alustalla, jota oli täydennetty 10 mM glukoosia, ja ne herätettiin 2 mM IPTG:llä ilmentämään maltoosiin sitoutuneeseen proteiiniin fuusioitunutta katkennutta PspA-proteiinia. Transformoituja *E. coli* -kantoja BC100 ja BAR416, jotka ilmensivät OmpA-johtosekvenssiin fuusioituneita PspA-kappaleita pIN-III-opmA3 -vektorissa, kasvatettiin vähimmäisalustassa ja ne herätettiin ilmentämään 2 mM IPTG:llä. Molemmat vektorit pIN-III-opmA3 ja pMal-p2 ovat vektoreita, joiden avulla fuusioproteiinit saadaan siirtymään periplasmiseen tilaan. Tästä syystä pMal-p2 -muodosteen sisältävistä bakteereista osmoottisella shokilla saatu uute johdettiin amyloosipylvään läpi sen puhdistamiseksi ja erotettiin SDS-PAGE Western blotting -tekniikalla. Kannan BC100 PspA:n avulla tuotettu kaniinin polyklonaalinen vasta-aine tunnisti kannoista BAR36A, BAR39, BAR66, BAR9739, BARL5, BAR6A ja BAR100 saatujen proteiiniuutteiden Western blot -täplän. WU2:sta saadun täysipi-

tuisen PspA:n ilmeinen M_r on 91,5 kD. Maltoosia sitovan proteiinin M_r on 42 kD ja fuusioproteiinin PspA-osan odotettu M^r on 12 kD. Kaikkien uutteiden molekyylipainot olivat alueella 54—80 kD. Tämän molekyylipainojen erilaisuuden voidaan selittää johtuvan eri pneumokokkikantojen *pspA*-geenin vaihtelevuudesta. Erilaisilla kloonatuilla kappaleilla pinnoitettuja levyjä käyttäen toteutettu ELISA varmisti kvantitatiivisesti reaktiivisuudet, jotka oli todettu kaikilla proteiiniuutteilla saaduissa Western-täplissä.

Kloonatuilla PspA-kappaleilla tuotettu suoja ja ristisuoja kohtalokasta pneumokokiinfektiota vastaan

CBA/N-hiiret immunoitiin pBC100:n koodaamalla katkennella PspA-kappaleella, joka koostuu Rx1 PspA:n aminohapoista 192—588, ja ne altistettiin 13 erilaiselle *S. pneumoniae* -kannalle, jotka edustivat 7 erilaista kapselityyppiä (Taulukko 4). Näiden kaikkien 13 kannan kohdalla immunointi suojasi kuolemalta tai pidensi kuolemaa edeltävää aikaa. Kymmenen kannan tapauksessa ero oli tilastollisesti merkittävä. Kapselityyppiä 3, 6A ja 6B olevien kantojen tapauksessa kaikki immunoidut hiiret oli saatu suojatuiksi kuolemalta. Vaikka kapselityyppien 2, 4 ja 5 tapauksessa eloonjääneiden hiirten lukumäärä olikin pienempi, niin kuitenkin immunointi BC100:lla johti kuolemaa edeltävän ajan merkittävään pitenemiseen.

BC100-immunointitutkimukset tekivät selväksi, että jäännökseen 192 nähden C-päätteen puolella sijaitsevat epitoopit voivat saada aikaan ristisuojan. BAR416-kappale, joka sisältää aminohapot 192—299, voi tuottaa suojan vain yhdellä altistavalla kannalla WU2 aiheutettua kohtalokasta infektiota vastaan. Tämä esimerkki osoittaa, että BAR416-immunointi voi suojata kuutta kantaa vastaan, joita kantoja vastaan oli saatu paras suoja BC100-immunoinnilla. Immunointi BAR416-muodosteella pidensi kuolemaa edeltävää aikaa kaikkien tutkittujen altistavien kantojen tapauksessa (taulukko 5). BAR416 tuotti merkittävän suojan WU2-, A66-, BG7322- ja EF6796-pneumokokin (vastaavasti kapselityyppiä 3, 3, 6B ja 6A) aiheuttamaa kuolemaa vastaan. Samoin, se pidensi ATCC6303- ja DBL6A-pneumokokeille (vastaavasti kapselityyppi 3 ja 6A) altistettujen hiirten elämää. BAR416-kappaleella

immunoiduista hiiristä saatu seerumi tuotti täysipituiselle Rx1 PspA:lle anti-PspA ELISA-tiitterin käänteisluvun geometriseksi keskiarvoksi 750. BC100:lla immunoitujen hiirten tiittereiden käänteisluvun geometrinen keskiarvo oli lähes 2000, kun taas immunoimattomien hiirten anti-PspA-tiitterit olivat alle 10.

Edellä esitetyn perusteella todetaan, että Rx1:stä peräisin oleva BAR416-kappale saa aikaan riittävän ristireaktiivisen immuniteetin ajatellen suojaa erilaisia pneumokokkeja vastaan, ja voidaan olettaa, että tämän alueen täytyy olla serologisesti säilynyt PspA-proteiinien keskuudessa. Tämä oletus varmistettiin immunoimalla seitsemästä erilaisesta kloonista peräisin olevalla, yhdistelmä-DNA -teknisellä homologisella BAR416-alueella ja altistamalla sitten kannalle WU2 (taulukko 6). Kaikki 7 immunogeenia tuottivat merkittävän suojan. Kapselityypeistä 2 ja 22 ja karkeasta R36A-kannasta peräisin olevat PspA-kappaleet tuottivat täyden suojan kuolemaa vastaan kaikissa altistetuissa hiirissä. Kaikki muut immunogeenit kykenivät pidentämään kaikkien hiirten kuolemaa edeltävää ajanjaksoa niin, että kuolemaan johtaneiden vuorokausien lukumäärän mediaani on 21 vuorokautta tai yli 21 vuorokautta. Homologisilla BAR416-kappaleilla immunoiduista hiiristä saadun seerumin anti-PspA-tiittereiden käänteisluvut olivat alueella 260 - 75 800, keskiarvon ollessa 5700, kun taas pelkästään maltoosia sitovalla proteiinilla immunoitujen vertailueläinten tapauksessa anti-PspA -tiittereiden käänteisluku oli alle 10.

Vasta-ainereaktiivisuudet

Kaikki edellä esitetyt immunointitutkimukset osoittavat asemissa 192—299 sijaitseviin aminohappoihin koodautuneiden epitooppien ristireaktiivisuuden. Tämä alue sisältää alfa-kierteisen alueen C-päätteen puoleisen kolmasosan sekä runsaasti proliinia sisältävän alueen ensimmäiset aminohapot. Lisäosoitus siitä, että tässä alueessa sijaitsevat epitoopit ovat ristireaktiivisia erilaisten PspA-proteiinien keskuudessa, saadaan yhdeksästä MAb-vasta-aineesta, jotka kaikki oli saatu immunoimalla Rx1 PspA:lla, koostuvan joukon ristireaktiivisuudesta. Neljän tähän joukkoon kuuluvan vasta-aineen epitoopit reagoivat aminohappojen 192 ja 260 väliin sijoittuvien epitooppien kanssa. Viiden muun tähän joukkoon kuuluvan MAb:n epitoopit sijaitsevat

aminohappojen 1 ja 115 välissä (McDaniel, L.S. et al., Microb. Pathog. 1994; 17: 323). Jokaisen näiden 9 MAb:n kyky reagoida kahdeksan erilaisen PspA:n kanssa Rx1:n lisäksi testattiin. Ne viisi MAb-vasta-ainetta, joiden epitoopit sijaitsivat ensimmäisten 115 aminohapon joukossa, reagoivat keskimäärin vain yhden muun PspA:n kanssa. Itse asiassa kolme näistä viidestä ei reagoinut näistä 8 muusta PspA:sta yhdenkään kanssa. Sitä vastoin kukin MAb, jonka epitooppi sijaitsee aminohappojen 192 ja 260 välissä, ristireagoi keskimäärin neljän tällaisen ei-Rx1 PspA:n kanssa näistä kahdeksasta ei-Rx1 PspA:sta, ja jokainen niistä reagoi vähintään kahden ei-Rx1 PspA:n kanssa. Näin ollen, tähän yksittäisten epitooppien rajallisen lohkon perusteella näyttää siltä, että aminohapoista 192—260 muodostuvassa alueessa sijaitsevat epitoopit ovat yleisesti paljon ristireaktiivisempia kuin aminohappojen 1 ja 115 välissä sijaitsevat epitoopit.

Rx1 PspA:n BC100-kappale voi tuottaa suojan kapseloitunutta, tyyppiä 3 olevaa WU2-kantaa vastaan. Vaikka näiden kahden kannan PspA-proteiinit voidaankin erottaa toisistaan serologisesti, ne ovat kuitenkin myös ristireaktiivisia (Crain, M.J., et al., Infect. Immun. 1990; 58: 3292). Aikaisempi havainto teki selväksi sen, että olemassa on Rx1:n ja WU2:n välillä ristisuojaavia epitooppeja. Jäännökseen 192 nähden C-päätteen puoleisessa alueessa esiintyvien ristireaktioiden tärkeys osoitetaan tässä esimerkissä, jossa 13 hiirelle virulenttia altistavaa kantaa on käytetty havaittavan suojan tuottamiseksi niitä kaikkia vastaan. Ensimmäinen osoitus siitä, että aseman 192 suhteen C-päätteen puolella sijaitsevat epitoopit kykenevät ehkä saamaan aikaan ristisuojan, saatiin aikaisemmasta tutkimuksestamme, jossa osoitimme, että MAb-vasta-aineet Xi64, XiR278, XiR1323 ja XiR1325, joiden epitoopit on kartoitettu Rx1-kannan PspA-aminohappojen 192 ja 260 väliin, saattavat suojata WU2-infektiolta. Lisäksi immunointi PspA-kappaleilla 192—588 ja 192—299 kykeni tuottamaan suojan WU2-infektiota vastaan. Tämä esimerkki osoittaa, että BC100 Rx1 -kappale (192-588) saa aikaan merkittävän suojan jokaista kolmeatoista erilaista, hiiressä virulenttia pneumokokkia vastaan, mikä osoittaa pitävällä tavalla aseman 192 suhteen C-päätteen puolella sijaitsevien epitooppien kyvyn saada aikaan suojaava vaste. Sen havainnon, että fuusioproteiini, joka sisältää C-päätteestään maltoosia sitovaan proteiiniin fuusioituneet aminohapot 192—299, voi myös saada aikaan

ristisuojan, perusteella voidaan vetää se johtopäätös, että tässä 107 aminohappoa käsittävässä PspA-alueessa sijaitsevat epitoopit riittävät saamaan aikaan merkittävän ristisuojan lukuisia erilaisia kantoja vastaan.

Osoitus siitä, että muidenkin PspA-molekyylien vastaava alue kykenee myös tuottamaan ristisuojan, saatiin niistä tutkimuksista, joissa Rx1 PspA:n 192—299-alueeseen nähden homologiset sekvenssit saatiin viidestä muusta PspA:sta. Nämä kaikki viisi kappaletta tuotti merkittävän suojan WU2-kannalla altistusta vastaan. Nämä tulokset viittaavat eräällä tavalla 192—299 -alueen tuottaman ristisuojan serologisiin eroihin.

Vaikka tässä ei halutakaan rajoittua mihinkään erityiseen teoriaan, niin kuitenkin tämänhetkisen tietämyksen perusteella esitetään, että kantojen D39, Rx1 ja R36A PspA -proteiinit ovat samanlaisia. Kaikki 9 hiirtä, jotka oli immunoitu kannoista R36A ja D39 peräisin olleille 192—299 -kappaleilla, selviytyivät hengissä WU2-altistuksesta. Ainoastaan LM100, joka on eräs muista kuin R36A/D39-kannoista peräisin oleva PspA, suojasi yhtä suuren prosentuaalisen osuuden hiiristä WU2:ta vastaan. Ero R36A/D39 PspA -molekyylien ja Rx1-kantaan liittymättömien PspA-proteiinien ansiota olevassa hengissäpysymisessä oli tilastollisesti merkittävä.

Näistä tuloksista nähdään kuitenkin, että kaikki erot suojauksessa erilaisia kantoja vastaan eivät johdu erilaisista serologisista ristireaktiivisuuksista. BC100, joka on saatu Rx1:stä, suojasi 100 % seitsemälle erilaisella *S. pneumoniae* -kannalle altistetuista hiiristä kuolemalta, mutta se vain viivästytty kuolemaa kannan D39 tapauksessa, jonka kannan D39 uskotaan käsittävän saman PspA:n kuin Rx1-kanta. Näin ollen eräät ristisuojauksessa todetut erot liittyvät epäilemättä joihinkin muihin tekijöihin kuin PspA-ristireaktiivisuuteen. Tällä hetkellä ei kuitenkaan vielä tiedetä sitä, liittyvätkö nämä tekijät eri kantojen erilaiseen virulenttisuuteen äärimmäisen herkässä Xid-hiiressä vai aminohappoon 192 nähden N-päätteen puolella sijaitsevien epitooppien erilaiseen tarpeeseen.

Näiden tulosten perusteella voidaan päätellä, että vain Rx1-aminohappojen 192—299 suhteen homologisia, yhdistelmä-DNA -teknisiä PspA-kappaleita sisältävä rokote on

tehokas pneumokokki-infektiota vastaan. Lisäksi tulokset osoittavat PspA:n aminohappojen 192—299, aminohappojen 192—260 ja niitä koodaavan DNA:n käyttökelpoisuuden, esimerkiksi alukkeita N192 tai 588 (LSM4:n ja LSM2:n muunnoksia) voidaan käyttää pneumokokkien läsnäolon ilmaisemiseksi ilmaisemalla sellaisen sekvenssin läsnäolo, joka sekvenssi sitoutuu tähän aminohappoon tai DNA:han, tai jota sekvenssiä tämä DNA monistaa, esimerkiksi käyttämällä tätä DNA:ta hybridisaatiokoettimena tai PCR-alukkeena tai käyttämällä aminohappoja vasta-ainesitoutumiseen perustuvissa reagenssipakkauksissa, määrityksissä tai testeissä; ja nämä tulokset osoittavat, että aminohappoja 192—299 ja aminohappoja 192—260 voidaan käyttää vasta-aineiden tuottamiseksi vasta-ainesitoutumiseen perustuvia reagenssipakkauksia, määrityksiä tai testejä varten.

Taulukko 4 Hiirten suojaaminen immunoimalla Rx1 PspA:sta peräisin olevalla BC100:lla

			BC100-immunogeeni			Vertailut			
Altistava kanta*	Kapseli-tyyppi	PspA-tyyppi	Elävät /kuolleet	Eloon-jäämis-%	Vrk, mediaani, jolloin elossa	Elävät /kuolleet	Eloon-jäämis-%	Vrk, mediaani, jolloin elossa	p-arvo[1]
D39	2	25	0/5	0 %	5	0/3	0 %	2	0,02
WU2	3	1	4/0	100 %	>21	0/3	0 %	3	0,002
ATCC6303	3	7	5/0	100 %	>21	0/5	0 %	7	0,004
A66	3	13	4/0	100 %	>21	0/3	0 %	1	0,03
EF10197	3	18	5/0	100 %	>21	0/3	0 %	2	0,02
EF5668	4	12	1/3	25 %	9	0/3	0 %	4	N.S.
EF3296	4	20	1/3	25 %	5	0/3	0 %	3	N.S.
LB1905	4	23	1/3	20 %	4	0/6	0 %	2	0,02
BG9739	4	26	0/4	0 %	6,5	0/3	0 %	2	N.S.
DBL5	5	33	0/5	0 %	5	0/3	0 %	2	0,02
BG7322	6	24	4/0	100 %	>21	1/2	33,3 %	6	0,03
EF6796	6A	1	4/0	100 %	>21	0/3	0 %	1	0,03
DBL6A	6A	19	5/0	100%	>21	0/3	0 %	1	0,03

* Hiiret altistettiin arviolta 10^3 CFU/ml olevalle määrälle kutakin kantaa
§P-arvot on saatu vertaamalla toisiinsa vuorokausia, jolloin vielä elossa, käyttäen yksiosaista Wilcoxon:in kahden näytteen järjestystestiä.

Taulukko 5 Hiirten suojaaminen immunoimalla Rx1 PspA:sta peräisin olevalla BAR416:lla

			BC100-immunogeeni			Vertailut			
Altistava kanta	Kapseli-tyyppi	PspA-tyyppi	Elävät /kuolleet	Eloon-jäämis-%	Vrk, mediaani, jolloin elossa	Elävät /kuolleet	Eloon-jäämis-%	Vrk, mediaani, jolloin elossa	p-arvo[1]
WU2	3	1	4/1	80 %	>21	0/3	0 %	1	0,002
ATCC6303	3	7	2/3	40 %	13	1/4	20 %	4	0,048
A66	3	13	5/0	100 %	>21	0/5	0 %	2	0,004
BG7322	6	24	3/2	60 %	8>21	0/4	0 %	7	0,02
EF6796	6A	1	3/2	60 %	>21	0/5	0 %	5	0,004
DBL6A	6A	19	0/5	0%	7	0/5	0 %	2	0,008

Huom: Hiiret oli immunoitu kulloinkin noin 10^3 CFU olevalla määrällä kutakin kantaa.

P-arvot on saatu vertaamalla toisiinsa vuorokausia, jolloin vielä elossa, käyttäen yksiosaista Wilcoxon:in kahden näytteen järjestystestiä.

Taulukko 6 Hiirten suojaaminen *S. pneumoniae* WU2-kantaa vastaan immunoimalla 7 PspA:n BAR416-analogeilla

Immuno-geeni	Lähtö-kanta	Kapseli-tyyppi	PspA-tyyppi	Elävät,lkm /kok. lkm	Eloon-jäämis-%	Vuorokaudet, mediaani, jolloin elossa	p-arvo* vs MBP
BAR36A	R36A	-	25	4/4	100 %	>21	0,002
BAR39	D39	2	25	5/5	100 %	>21	0,0008
BAR66	A66	3	13	7/8	88 %	>21	<0,0001
BAR9739	BG9739	4	26	5/8	63 %	>21	0,0002
BARL5	DBL5	5	33	4/8	50 %	21	0,03
BAR6A	DBL6A	6a	19	3/8	80 %	>21	0,05
BAR100	LM100	22	ND	5/5	60 %	>21	0,0008
MBP	-	-	-	0/8	0 %	2	-

*P-arvot on saatu vertaamalla toisiinsa vuorokausia, jolloin vielä elossa, käyttäen yksiosaista Wilcoxon:in kahden näytteen järjestystestiä.

Huom: Immunointiin käytetyt PspA-kappaleet kloonattiin alukkeilla LSM4 ja LSM6 monistetuista tuotteista. Edellä lueteltujen kantojen lisäksi PCR-reaktiot sopivan kokoisten kantojen BG9163, WU2, L81905, EF6796, EF5668, BG7376, BG7322 ja BG5-8A LSM4- ja LSM6-monistettujen tuotteiden kanssa.

Taulukko 7 Monoklonaalisten vasta-aineiden MAb reaktiivisuus eri pneumokokkien PspA-proteiinien kanssa

Testi-PspA:n luovuttaja			MAb-kartoitus aminohappoihin 1-115					MAb-kartoitus aminohappoihin 192-260			
Kanta	**Kapseli-tyyppi**	**PspA-tyyppi**	**XI126 IgG2b**	**XIR1224 IgM**	**XIR1526 IiG2b**	**XIR35 IgG2a**	**XIR16 IgG2a**	**XIR1323 IgM**	**XI64 IgM**	**XIR278 IgG1**	**XIR1325 IgG2a**
Rx1	rough	25	++	++	++	++	++	++	++	++	++
ATCC101813	3	3	++	-	-	-	-	++	++	++	++
EF10197	3	18	-	-	-	-	-	-	-	++	+/-
BG9739	4	26	-	-	-	-	-	++	-	+	++
LB1905	4	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BG-5-8-A	6A	0	+/-	+	-	-	-	+	-	+	-
BG9163	6B	21	-	-	-	-	-	-	-	+	-
LM100	22	N.D.	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
WU2	3	1	++	-	-	-	-	++	++	++	++

Huom: Immuunitäpläanalyysi toteutettiin yhdeksällä tästä tutkimuksesta peräisin olevalla MAb:lla yhdeksästä erilaisesta pneumokokkikannasta muodostuvaa joukkoa vastaan. Rx1 toimi positiivisena vertailuna. Tulokset on esitetty muodossa ++ (vahva reaktio), + (heikko, mutta selvästi positiivinen reaktio), +/- (vaikea ilmaista), - (ei reaktiota). Kaikkien kantojen PspA tuotti positiivisen reaktion PspA:ta vastaan vaikuttavan kaniinin antiseerumin kanssa. N.D. tarkoittaa ei määritetty. Epitoopit kartoitettiin Rx1-kannan PspA-kappaleista.

Esimerkki 3 PspA:n ja sen katkenneiden muotojen eristäminen ja immunointi niillä

PspA on kiinnittynyt pneumokokin pintaan PspA:ssa olevalla koliinin sitomiskohdalla. Tätä voidaan käyttää hyväksi käyttökelpoisissa menetelmissä täysipituisen PspA:n [full length (FL-) PspA] eristämiseksi. PspA voidaan irrottaa pneumokokin pinnasta eluoimalla 2-prosenttisella koliinikloridilla (CC) tai kasvattamalla kemiallisesti määritetyllä alustalla (chemically defined medium; CDM), joka sisältää 1,2 % CC (CDM-ET). Koska CDM-ET-supernatanteista puuttuvat suuret koliinipitoisuudet, niin niihin vapautunut PspA voidaan adsorboida koliinipylvääseen (tai koliinianalogipylvääseen) ja eristää eluoimalla tästä pylväästä 2 % koliinikloridilla (CC).

Tässä esimerkissä on kuvattu mahdollisuus saada PspA:ta tällä tavalla menettelemällä sekä tällä tavalla menettelemällä saadun PspA:n kyky tuottaa suoja hiirissä pneumokokkien aiheuttamaa, muuten kohtalokasta verenmyrkytystä vastaan. Tässä käytettiin kannoista R36A, Rx1 ja WU2 peräisin olevaa luonnollista PspA:ta, koska näitä kantoja on käytetty aikaisemminkin tutkimuksissa, joilla on pyritty selvittämään PspA:n kyky tuottaa suojaava immuniteetti (katso esim. edellä ja jäljempänä olevat esimerkit). Ensimmäiset monoklonaaliset vasta-aineet PspA:ta vastaan tehtiin kannasta R36A peräisin olevaa PspA:ta vastaan ja PspA:n ja PspA-mutanttien ensimmäiset kloonatut kappaleet olivat peräisin kannasta Rx1. Kanta Rx1 oli saatu kannasta R36A, joka oli puolestaan peräisin kapselityyppiä 2 olevasta D39-kannasta. Näistä kolmesta kannasta peräisin olevat PspA:t näyttävät olevan samanlaiset serologisen analyysin ja molekyylipainoanalyysin perusteella. Molekyylitutkimukset eivät ole osoittaneet minkäänlaisia eroja kantojen D39, Rx1 ja R36A *pspA*-geeneissä. Kolmas kanta, josta tässä esimerkissä saatiin PspA:ta, on hiiressä virulentti, kapselityyppiä 3 oleva WU2-kanta. Sen PspA on erittäin ristireaktiivista kannoista R36A ja Rx1 peräisin olevan PspA:n kanssa ja immunointi Rx1 ja D39 PspA:lla voi suojata kannan WU2 aiheuttamia, muutoin kohtalokkaita infektioita vastaan.

S. pneumoniae

Tässä tutkimuksessa käytetyt *S. pneumoniae* -kannat on kuvattu aikaisemmin (taulukko 8). Bakteereita kasvatettiin joko Todd-Hewitt-alustassa, joka sisälsi 0,5 % hiivauutetta (THY), tai kemiallisesti määritellyssä alustassa (CDM), jotka alustat on kuvattu aikaisemmin [32, 43]. Varastoviljelmien peräkkäisiä siirtoja vältettiin. Kantoja pidettiin pakastettuina 20 % glyserolia sisältävässä THY-alustassa ja niitä viljeltiin kaapimalla soluja jäätyneestä viljelmästä.

PspA:n ottaminen talteen pneumokokeista

PspA:ta ei esiinny pneumokokkien kasvatusalustassa, mikäli pneumokokit eivät ole saavuttaneet stationaarivaihetta ja mikäli itsehajotus ei ole alkanut [36]. Kolmea menettelytapaa käytettiin PspA:n vapauttamiseksi pneumokokista. Eräässä lähestymistavassa pneumokokkeja kasvatettiin 100 ml:ssa THY-alustaa ja solut otettiin talteen sentrifugoimalla logaritmisen kasvuvaiheen puolivälissä. Solukasauma pestiin kolme kertaa laktatoidussa Ringer:in liuoksessa (Abbot Lab., North Chicago, IL), ne suspendoitiin pieneen tilavuuteen liuosta, joka sisälsi 2 % koliinikloridia fosfaatilla puskuroidussa suolaliuoksessa (PBS) (pH 7,0), inkuboitiin 10 minuuttia huoneen lämpötilassa ja sentrifugoitiin kokonaisten pneumokokkien poistamiseksi. Alkuperäisen viljelmän, suspendoidun solukasauman ja supernatantin peräkkäisistä laimennuksista anti-PspA MAb Xi126[48]:n kanssa muodostettujen immuunitäplien perusteella oli selvää, että tämä menettelytapa vapautti noin puolet pneumokokeissa alunperin läsnä olleesta PspA:sta. Hopeavärjättyjen polyakryyliamidigeelien analyysi osoitti, että tämä supernatantti sisälsi proteiineja PspA:n lisäksi[36].

Kahdessa muussa toimenpiteessä käytettyä CDM-alustaa muokattiin Van der Rijn:in alustaan nähden[43]. Se sisälsi 0,03 % koliinikloridia normaalia kasvua varten. Jotta PspA saataisiin irtoamaan bakteerikasvun aikana, pneumokokkeja kasvatettiin 1,2 % koliinikloridia sisältävässä CDM-alustassa (CDM-CC) tai sellaisessa CDM-alustassa, joka sisälsi 0,03 % etanoliamiinia ja vain 0,000 001 % koliinia (CDM-ET). Sellaisessa alustassa, josta normaali koliinipitoisuus puuttuu, F-antigeeni ja C-polysakkari-

di sisältävät fosfoetanoliamiinia eikä fosfokoliinia [49]. CDM-CC- ja CDM-ET-alustoissa PspA vapautuu pneumokokkien pinnalta, koska se ei kykene sitoutumaan lipoteikoiinihappojen koliineihin [36]. Sen lisäksi, että kasvatus CDM-CC- tai CDM-ET -alustalla johtaa PspA:n vapautumiseen pneumokokin pinnalta, se helpottaa PspA:n eristämistä muiden, soluseinämään kohdistuvien vaikutustensa johdosta. Näissä alustoissa ei tapahdu pneumokokkien itsehajoamista[49], joten ne voidaan kasvattaa stationaarivaiheeseen saakka PspA:n saannon maksimoimiseksi. Näissä alustoissa ei tapahdu septatoitumista ja pneumokokit kasvavat pitkinä ketjuina[36,49]. Kun pneumokokit saavuttavat stationaarivaiheen, ne kuolevat, lakkaavat tuottamasta PspA:ta ja erottuvat nopeasti alustasta. Alustavat tutkimukset, joissa on käytetty peräkkäisten laimennusten pistetäpliä PspA:n määrän määrittämiseksi, ovat osoittaneet, että PspA:n tuotanto lakkaa suurin piirtein silloin, kun pneumokokit alkavat laskeutua, jolloin samalla muodostuu näkyviä, tiivistyneistä pneumokokkiketjuista muodostuvia rihmoja. Kun pneumokokit alkoivat laskeutua, alusta otettiin talteen sentrifugoimalla nopeudella 2900 x g 20 minuuttia ja se suodatettiin pieniä proteiinimääriä sitovalla suodattimella (0,45 μ Nalgene Tissue Culture Filter no. 158-0045).

CDM-CC- tai CDM-ET-alustalla kasvattamista varten pneumokokit totuteltiin ensin määriteltyyn alustaan ja sitten CDM-ET-alustan tapauksessa hyvin pieniin koliinipitoisuuksiin. Tätä varten kantoja siirrostettiin ensin 1 osaan THY-alustaa ja 9 osaan CDM-alustaa, joka sisälsi 0,03 % koliinia ja 0,03 % etanoliamiinia. Sen jälkeen, kun oli muodostettu kaksi peräkkäistä aliviljelmää CDM-alustaan, joka sisälsi 0,03 % koliinia ja 0,03 % etanoliamiinia (0,1 ml viljelmää + 0,9 ml esilämmitettyä tuotetta alustaa), tätä viljelmää siirrostettiin CDM-alustaan, joka sisälsi vain 0,003 % koliinia (ja 0,03 % etanoliamiinia). Nämä vaiheet toistettiin, kunnes kanta kasvoi CDM-ET-alustassa, joka sisälsi 0,000 001 % koliinia ja 0,03 % etanoliamiinia. Kriittistä oli se, että viljelmät siirrettiin eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa (noin 10^7 CFU/ml). Alustan kontaminoituminen vähäiselläkin määrällä eksogeenista koliinia johti siihen, ettei PspA kyennyt vapautumaan pneumokokkien pinnalta[36]. Näin ollen kertakäyttöisiä muovitarvikkeita käytettiin CDM-ET -alustan valmistamiseksi ja viljelmien kasvattamiseksi. Sen jälkeen, kun kanta oli totuteltu CDM-ET -alustaan,

se pakastettiin 80 % CD-ET-alustaa ja 20 % glyserolia sisältävässä seoksessa -80 °C:n lämpötilassa. Myöhemmin tätä kantaa kasvatettaessa se siirrostettiin suoraan CDM-ET-alustaan.

Luonnollisen (täysipituisen) PspA:n eristäminen

PspA eristettiin CDM-ET -alustalla kasvatettujen solujen alustasta käyttäen koliini-Sepharose-geeliä, joka oli valmistettu konjugoimalla koliinia epoksilla aktivoituun Sepharose-geeliin[50]. Erillistä pylvästä käytettiin eri kantojen alustoille, millä pyrittiin välttämään niiden erilaisten PspA-proteiinien ristikontaminaatio. PspA:n eristämiseksi kirkastetusta CDM-ET-alustasta koliini-Sepharose-geelin avulla sitä käytettiin petinä, jonka tilavuus oli 0,6 ml. Pylväspetin korkeus oli noin 0,5 cm ja sen halkaisija oli 1,4 cm. Virtausnopeus alustan lisäämisen ja pesun aikana oli noin 3 ml/min. Sen jälkeen, kun pylvääseen oli lisätty 300 ml CDM-ET-supernatanttia, pylväs pestiin 10 kertaan 3 ml:n tilavuudella 50 mM Tris-asetaatti-puskuria, pH 6,9, joka sisälsi 0,25 M NaCl (TAB). Pestyä pylvästä eluoitiin peräkkäin 3 ml:n tilavuuksilla TAB-puskuria, joka sisälsi 2 % koliinikloridia. Pylväästä eluoitunut proteiini mitattiin (BioRad-proteiinimääritys, BioRad, Hercules, CA). Pylvästä seurattiin kvantitatiivisella dot blot -määrityksellä. Pylvääseen lisätystä materiaalista, pesuliuoksesta ja eluoituneesta materiaalista muodostettiin pistetäplä ("dot blot"; 1 μl) laimentamattomana sekä 1/4-, 1/16-, 1/64-, 1/256- sekä 1/1024-laimennuksina nitroselluloosalle. Sitten kalvot salvattiin 1 % BSA:lla PBS-liuoksessa, niillä inkuboitiin 1 tunnin ajan PspA-spesifistä monoklonaalista vasta-ainetta Xi126 tai XiR278, ja ne kehitettiin biotinyloidulla vuohen anti-hiiri Ig:lla, alkaliseen fosfataasiin konjugoidulla streptavidiinilla (Southern Biotehcnology Associates Inc., Birmingham, AL) sekä substraattina toimivalla nitrosininen-tetratsoliumilla ja 5-bromi-4-kloori-3-indoyylifosfaatti-p-toluidiinisuolalla (Fisher Scientific, Norcross GA)[17]. Eluoituneen PspA:n puhtaus varmistettiin hopeavärjätyillä (reagenssipakkaus hopeavärjäämiseksi, BioRad, Hercules, CA) SDS-PAGE -geeleillä, jotka oli ajettu aikaisemmin kuvatulla tavalla[32]. SDS-PAGE -geelien immunotäplät kehitettiin monoklonaalisilla vasta-aineilla Xi126 ja XiR278[17].

29 kDa:n PspA:n eristäminen

29 kDa:n kappale, joka käsitti PspA:n N-päätteen 260 aminohappoa, tuotettiin *E. coli* DH1 -kannassa muodosteesta pJY4306[31, 37]. Yön aikana saatua JY4306-viljelmää kasvatettiin 100 ml:ssa Luria Broth -alustaa (LB), joka sisälsi 50 μg/ml ampisilliinia. Viljelmää kasvatettiin 37 °C:ssa, ravistelijassa nopeudella 225 kierr./min. Tätä viljelmää käytettiin siirrosteena kuudessa yhden litran viljelmässä, joita kasvatettiin samoissa olosuhteissa. Kun viljelmän optinen tiheys saavutti arvon 0,7 aallonpituudella 600 nm mitattuna, 12 g soluja otettiin talteen märkänä tahnana 4 °C:ssa nopeudella 12 000 x g. Solukasauma pestiin 10 tilavuudella 25 mM Tris-puskuria, pH 7,7, 0 °C:ssa, ja suspendoitiin 600 ml:aan liuosta, joka sisälsi 20 % sakkaroosia, 25 mM Tris pH 7,7 ja 10 mM etyleenidiamiinitetraetikkahappoa (EDTA), 10 minuutiksi. Solukasauma muodostettiin sentrifugoimalla (800 x g) ja se suspendoitiin nopeasti 900 ml:aan 1-prosenttista sakkaroosia, joka sisälsi 1 mM Pefabloc SC-hydrokloridia (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN) 0 °C:ssa. Suspensio kasautettiin nopeudella 8000 x g 4 °C:ssa. Proteiini saostettiin periplasmisesta uutteesta 70-prosenttisesti kylläisellä ammoniumsulfaatilla yön yli 4 °C:ssa 30 minuuttia. Saostunut proteiini suspendoitiin uudestaan 35 ml:aan liuosta, joka sisälsi 20 mM histidiinia, 1 % sakkaroosia, pH 6,6 (HSB). Liukenematon materiaali poistettiin nopeudella 1000 xg 4 °C:ssa 10 minuutin ajan. Kirkastettua materiaalia dialysoitiin HSB-liuosta vastaan, se johdettiin 0,2 μm suodattimen läpi ja sitä puhdistettiin edelleen 1 ml MonoQ HR 5/5-pylväällä (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, N.J.), jota oli tasapainotettu HSB-liuoksella. Kirkastettua materiaalia lisättiin pylvääseen nopeudella 1 ml/min, ja pylväs pestiin 10 pylvään tilavuudella HSB-liuosta. Sitten pylvästä eluoitiin virtausnopeudella 1 ml/min käyttäen 5 mM NaCl gradienttimuutosta minuutissa. PspA eluoitui yhtenä piikkinä noin alueella 0,27-0,30 M olevalla NaCl-pitoisuudella, mikä todettiin Xi126:n kanssa muodostetun immunotäplän, SDS-PAGE:n ja absorbanssin perusteella. SDS-PAGE -määrityksen perusteella tämä materiaali oli arviolta 90-prosenttisesti puhdasta. Saanto 6 litrasta viljelmää oli 2 mg (BioRad-proteiinimääritys) yhdistelmä-DNA -teknistä PspA:ta.

Pneumokokkien kasvatus altistusta varten

Hiiret altistettiin logaritmisessa kasvuvaiheessa oleville, THY-alustassa kasvatetuille pneumokokeille. Altistusta varten pneumokokit laimennettiin suoraan laktatoituun Ringer:in liuokseen ilman edeltävää pesua tai sentrifugointia. Jotta injektioon saataisiin toivottu lukumäärä pneumokokkeja, niiden pitoisuus laktatoidussa Ringer:in liuoksessa asetettiin vastaamaan noin 0,2 olevaa optista tiheyttä (O.D.) aallonpituudella 420 nm (LKB Ultrospec III spektrofotometri). Läsnäolevien pneumokokkien lukumäärä laskettiin pitoisuudesta $5x10^8$ CFU/ml/O.D. ja varmistettiin laskemalla siirrosteen laimennussarjoilla saatujen pesäkkeiden lukumäärä (veriagarilla).

Hiirten immunointi, altistaminen ja verinäytteen otto

CBA/CAHN/XID/J (CB A/N)- ja BALB/cByJ (BALB/c) -hiiret hankittiin toimitajalta Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME. Hiirille annettiin kaksi injektiota kahden viikon välein ja ne altistettiin laskimon sisäisesti kaksi viikkoa myöhemmin. Injektiot ilman täydellistä Freund:in apuainetta annettiin vatsaontelon sisäisesti 0,1 ml:ssa Ringer:in liuosta. Mikäli aiheellista, ensimmäinen injektio annettiin Freund:in täydellisessä apuaineessa (CFA), ja se koostui arviolta suhteessa 1:1 antigeeniliuoksen ja CFA-öljyn (Difco, Detroit MI) välisestä emulsiosta. CFA:ssa oleva antigeeni injektoitiin nivustaipeeseen 0,2 ml:ssa, jaettuna kahden takatasssun välille. Kaikille hiirille annettiin tehoste vatsaontelon sisäisesti ilman apuainetta. Kun hiiriin injektoitiin alustan supernatanttia tai kokonaisten bakteereiden 2-prosenttisia koliinikloridieluaatteja, niin tällöin injektoidut ainemäärät esitettiin sen alustan, josta injektoitu materiaali oli peräisin, tilavuutena. Esimerkiksi, mikäli immunointiin käytettiin CDM-CC- tai CDM-ET -alustalla kasvatetuista pneumokokeista saatua kirkastettua alustaa laimentamatta tai väkevöimättä, niin tällöin annokseksi kuvattiin 100 μl. Mikäli materiaali laimennettiin ensin suhteessa 1/10 tai mikäli se väkevöitiin 10-kertaisesti, niin tällöin annokseksi ilmoitettiin vastaavasti 10 μl tai 1000 μl.

PspA-vasta-aineiden ELISA

Erityiset muunnokset aikaisemmin kuvattuihin ELISA-olosuhteisiin[17] kuvataan. Mikrotiitterilevyt (Nunc Maxisorp, P.G.C. Scientific, Gaithersburg MD) pinnoitettiin CDM-ET -alustalla kasvatettujen Rx1- ja WG44.1-pneumokokkien laimentamattomilla supernatanteilla tai 1-prosenttisella BSA:lla PBS-liuoksessa. Hiiristä otettiin verta silmämunan takaa (75 μl) heparinisoituun kapillaariputkeen (Fisher Scientific, Fair Lawn, N.J.). Veri laimennettiin välittömästi 0,5 ml:aan liuosta, joka sisälsi 1 % naudan seerumin albumiinia PBS-liuoksessa. Tuloksena saatujen seerumien laimennus oli 1/15 perustuen 47 olevaan keskimääräiseen hematokriittiarvoon. Seerumit laimennettiin seitsemänä kolminkertaisena laimennuksena mikrotiitterilevyjen kuopissa, alkaen suhteesta 1/45. Positiivisena vertailuna käytettiin monoklonaalista vasta-ainetta Xi126. Monoklonaalisella vasta-aineella Xi126 todettu suurin toistettava O.D. määriteltiin "suurimmaksi O.D.-arvoksi". Ilman immuuniseerumia tai monoklonaalista vasta-ainetta saatu O.D. määriteltiin "pienimmäksi O.D.-arvoksi". Vasta-ainetiitterit määriteltiin laimennuksena, jolla saatu arvo on 33 % suurimmasta O.D.-arvosta. Sitoutuminen Rx1 CDM-ET-pinnoitettuihin levyihin todettiin PspA-spesifiseksi, sillä yhdessäkään tapauksessa ei saatu arvoa, joka olisi ollut $\geq$33 % immuuniseerumin tai Xi126-vasta-aineen suurimmasta sitoutumisesta WG44.1 CDM-ET:lla tai BSA:lla pinnoitetuilla levyillä.

Tilastollinen analyysi

Mikäli toisin ei ole esitetty, P-arvoilla tarkoitetaan vertailua Wilcoxin:in kahden näytteen järjestystestin avulla eri ryhmissä kuolemaan johtaneiden vuorokausien lukumäärien vertaamiseksi. 21 vuorokauden jälkeen elossa oleviin hiiriin liitettiin 22 oleva arvo laskentaa varten. P-arvoja, jotka olivat $<0,05$, ei katsottu merkittäviksi. Koska milloinkaan ei olla todettu, että immunointi PspA:lla tai muilla antigeeneilla lisäisi pneumokokkien infektiokykyä, niin P-arvot on laskettu yksiosaisina testeinä. P-arvojen, jotka olisi saatu kaksiosaisella testillä, määrittämiseksi esitetyt arvot pitää kertoa kahdella. Eräissä tapauksissa P-arvot on esitetty toisaalta elävien ja toisaalta kuolleiden vertaamiseksi. Nämä arvot on laskettu aina Fisherin täsmätestillä. Kaikki

tilastolliset laskutoimenpiteet toteutettiin Macintosh-tietokoneella käyttäen InStat-ohjelmaa (San Diego, CA). PspA on CDM-ET- tai CDM-CC -alustalla kasvatetusta pneumokokista vapautunut suuri suojan tuottava komponentti, tai joka saadaan vapautumaan tavanomaisella tavalla kasvatetuista pneumokokeista eluoimalla 2 % CC-liuoksella.

Pneumokokeista saadut, PspA:ta sisältävät liuokset kykenivät suojaamaan hiiret kohtalokkaalta verenmyrkytykseltä sen jälkeen, kun ne oli altistettu laskimon sisäisesti $3x10^3$:lle (100 x LD_{50}) kapselityyppiä 3 olevalle *S. pneumoniae* -eliölle (taulukko 9). Vastaavat valmisteet kannoista eivät kyenneet saamaan aikaan suojaa. Eristämismenetelmästä riippumatta pienin suojaava annos saatiin 10—30 μl:sta kasvatettujen pneumokokkien alustaa. Samoin totesimme, että normaalissa THY- tai CDM-alustassa kasvatettujen, logaritmisessa kasvuvaiheessa olevien pneumokokkien supernatantit eivät kyenneet tuottamaan suojaa (tuloksia ei ole esitetty). Tämä havainto on yhtäpitävä aikaisempien tutkimusten[36, 37] kanssa, jotka tutkimukset osoittavat, ettei PspA:ta vapaudu normaalisti määränä pneumokokkien kasvatusalustaan.

Eristetty PspA voi tuottaa suojan kohtalokasta infektiota vastaan

Vaikka PspA olikin välttämätön näissä valmisteissa suojan tuottamista ajatellen, niin kuitenkin oli mahdollista, ettei se vaikuttanut yksin. Niinpä hiiret immunoitiin puhdistetulla FL-PspA:lla vastauksen löytämiseksi tähän kysymykseen.

FL-PspA:n eristäminen CDM-ET-kasvualustasta

FL-PspA eristettiin CDM-ET -alustasta eikä CDM-CC -alustasta tai 2-prosenttisella koliinikloridilla saadusta elävien solujen eluaatista, koska viimeksi mainituissa liuoksissa läsnä olevat suuret koliinipitoisuudet estävät PspA:n adsorption koliini-Sepharose-pylvään koliinijäännöksiin. Immunointiin tarkoitettu PspA eristettiin R36A-kannasta, koska tämä kanta on kapseloitumaton ja näin ollen eristetty PspA ei voi olla kontaminoitunut kapselipolysakkaridilla. Vertailuna toteutettiin vale-eristämi-

nen WG44.1-kannasta, koska tämä kanta käsittää inaktiivisen *pspA*-geenin eikä se siis tuota PspA:ta. Taulukossa 10 esitetyt tulokset ovat tyypillisiä eristeille, jotka on saatu 300 ml:sta CDM-ET-alustaa, jolla on kasvatettu R36A-pneumokokkeja. 300 ml:sta alustaa eristettiin 84 μg PspA:ta, eli noin 280 μg/litra. Dot blot -tulosten perusteella tämä näyttää olevan noin 75 % alkuperäisessä alustassa läsnä olevasta PspA-määrästä, jolloin siis R36A-viljelmien CDM-ET sisältää PspA:ta noin 400 μg/litra eli noin 0,4 μg/ml.

WG44.1-viljelmien CDM-ET -alustassa ei todettu lainkaan serologisesti havaittavaa PspA:ta. Merkittävämpää oli, että koliini-Sepharose -pylväästä saatiin talteen havaitsematta jäänyttä proteiinia WG44.1-viljelmästä saadun CDM-ET -alustan adsorption jälkeen, mikä osoittaa, että PspA on ainoa proteiini, joka voidaan eristää tällä tavalla menettelemällä. Lisäksi hopeavärjätyn SDS PAGE-geelin perusteella R36A:sta eristetty PspA näytti olevan homogeenista (kuvio 3). Vaikka myös autolysiiniä voidaan eristää koliini-Sepharose -pylväällä[20-50], emme kuitenkaan odottaneet tämän menettelytavan eristäneen sitä, koska autolysiiniä ei vapaudu koliinia sisältämättömällä alustalla kasvatetuista pneumokokeista[36]. Eristetyn PspA:n immunologisen puhtauden osoitti myös se tosiseikka, ettei immunointi sillä tuottanut mitään sellaisia vasta-aineita, jotka olisi voitu ilmaista WG44.1-kannan CDM-ET -supernatanteilla pinnoitetuilla levyillä.

300 millilitraa suuremman näytteen johtaminen pylvään, jossa petitilavuus oli 0,6 ml, läpi ei johtanut suurempaan saantoon, minkä perusteella voidaan olettaa, että pylvään kapasiteetti oli saavutettu. Kuitenkin koliini-Sepharose -petin syvyyden suurentaminen arvoa 0,5 cm suuremmaksi pienensi pylväästä eluoituneen PspA:n määrää, minkä oletettiin johtuvan kasautumien epäspesifisestä pidättymisestä pylväsmatriisiin. Eluointipuskuri sisältää 50 mM Tris-asetaattia, 0,25 M NaCl ja 2 % koliinikloridia. Eluointi ilman lisättyä NaCl:ia tai käyttämällä 1M NaCl-liuosta johti pienempiin saantoihin. Eluointi pienemmällä kuin 1 % CC-pitoisuudella pienensi myös saantoja.

Hiirten immunointi puhdistetulla R36A PspA:lla

Immunointiin käytettiin vain R36A-pylväästä saatua ensimmäistä 3 ml:n fraktiota. Hiiret immunoitiin kahdella injektiolla, jotka sisälsivät 1, 0,1 tai 0,01 μg R36A PspA:ta, antaen toinen injektio kaksi viikkoa ensimmäisen jälkeen. Vertailun mahdollistamiseksi eräisiin hiiriin siirrostettiin vastaavina laimennuksina WG44.1-pylvään ensimmäistä 3 ml:n fraktiota. Puhdistettu FL-PspA tuotti vasta-ainetta PspA:lle kaikkien annoskokojen tapauksessa riippumatta siitä, oliko CFA:ta käytetty apuaineena (taulukko 11). Ilman CFA:ta vasta-aineen suurimmat pitoisuudet saatiin 1 μg olevalla PspA-annoksella. Kuitenkin CFA:ta käytettäessä 0,1 μg:n annos oli yhtä immunogeninen kuin 1 μg:n annos.

Jotta saataisiin selville näiden erilaisten PspA-annosten kyky tuottaa suoja altistukselle me infektoimme immunoidut hiiret kahdella kapselityyppiä 3 olevalla kannalla, WU2 ja A66. Vaikka nämä molemmat kannat kykenevät tappamaan hyvin herkät CBA/N XID-hiiret arvoa 10_2 pienemmällä annoksella altistettaessa, niin kuitenkin A66-kanta on useita logaritmeja virulentimpi BALB/C-hiirissä [47, 52]. A66- ja WU2-kantojen virulenttisuusero kompensoitiin osittain altistamalla immunoidut CBA/N-hiiret pienemmille annoksille A66-kantaa kuin WU2-kantaa.

Sen jälkeen, kun CBA/N-hiiret oli immunoitu 1 ja 0,1 μg:n annoksilla PspA:ta, me totesimme suojan WU2-altistusta vastaan riippumatta siitä, oliko CFA:ta käytetty apuaineena vai ei (taulukko 4). Pienimmällä annoksella eli 0,01 μg PspA:ta, suurin osa PspA:lla + CFA immunoiduista hiiristä oli elossa, kun taas suurin osa pelkällä PspA:lla immunoiduista hiiristä ei ollut elossa; ero ei ollut kuitenkaan tilastollisesti merkittävä. Kun immunoidut hiiret altistettiin virulentimmalle A66-kannalle [47, 53], niin eloon jääneitä hiiriä todettiin vain 1 ja 0,1 μg olevilla annoksilla immunoitujen hiirten joukossa. Suoja oli jonkin verran parempi kohtalokasta A66-infektiota vastaan CFA:ta käyttäen immunoitujen hiirten keskuudessa kuin ilman tätä apuainetta, mutta tämä ero ei ollut tilastollisesti merkittävä. Kun kahden näytteen järjestystestin avulla analysoitiin A66-kannalle infektoitujen hiirten kuolemaan johtanutta aikaa, niin

tällöin kussakin immunoidussa ryhmässä todettiin tilastollisesti merkittävä viive kuolemaan johtaneessa ajassa yhdistämällä saatuihin vertailuihin nähden.

PspA:n 29 kDa:n N-päätteen kappale voi saada aikaan suojan infektiota vastaan yhdessä CFA:n kanssa injektoituna

Olemme verranneet eristetyn, 29 kDa:n suuruisen, PspA:n ensimmäisestä 260 aminohaposta koostuvan kappaleen immunogeenisyyttä, joka saavutetaan yhdessä CFA:n kanssa ja ilman sitä. Toisin kuin FL-PspA:n tapauksessa tämä 29 kDa:n suuruinen kappale edellytti apuaineen käyttöä suojaavan vasteen tuottamiseksi. Näin todettiin, vaikka tämän 29 kDa:n suuruisen antigeenin käytetyt immunoivat annokset olivat 10 ja 30 μg/hiiri eli noin 100- ja 300-kertaiset verrattuna niihin FL-PspA:n vähimmäisannoksiin, jotka voivat saada aikaan suojan ilman apuainetta.

Injektio yhdessä CFA:n kanssa paljasti ylimääräisen, suojan tuottavan antigeenin (antigeenien) läsnäolon CDM-CC- ja CDM-ET-kasvatusalustoissa, ei kuitenkaan elävien solujen 2 % koliiniakloridia sisältävissä eluaateissa

Se havainto, että Freund:in apuaineella voi olla näin suuri vaikutus 29 kDa:n suuruisen kappaleen immunogeenisyyteen (taulukko 12), sai meidät tutkimaan uudestaan taulukossa 2 kuvattuja immunogeeneja, jotta voitaisiin saada selville, suurentaako immunointi yhdessä apuaineen kanssa PspA:ta sisältävillä valmisteilla aikaansaatua suojaa, tai jotta voitaisiin osoittaa PspA:n lisäksi muiden antigeenien tuottama suoja. Kun ensimmäisessä injektiossa käytettiin CFA:ta, niin PspA:ta sisältävän kasvatusalustan (CDM-CC ja CDM-ET) se annos, joka tarvitaan suojan aikaansaamiseksi, pieneni arvosta 10-30 μl (taulukko 9) arvoon 1—3 μl (taulukko 13). Kun CFA:ta käytettiin apuaineena yhdessä PspA$^-$-kannoista WG44.1 ja JY1119 saatujen CDM-CC- ja CDM-ET -alustojen kanssa, niin suojaava immuunivaste saatiin aikaan, jos eläimiin injektoitiin suuremmasta tai yhtäsuuresta kuin 100 μl olevasta alustamäärästä peräisin oleva materiaali. Näin ollen vaikka CDM-CC- ja CDM-ET -kasvatusalustoissa olikin ilmeisesti läsnä PspA:n lisäksi joitakin muita suojan tuottavia kom-

ponentteja, niin kuitenkin PspA oli pääasiallinen suojan tuottava komponentti myös apuaineen läsnä ollessa.

Eräs injektoitu alusta oli CDM-ET -alusta, jossa oli kasvatettu JY2141-kantaa. Tämä alusta tuotti suojan WU2-altistusta vastaan niinkin pienillä kuin 1 μl olevilla injektoiduilla annoksilla. Huomattakoon, että vaikka tämä kanta ei tuotakaan täysipituista PspA:ta, se erittää kasvatusalustaan PspA:n ensimmäisistä 115 aminohapoista koostuvia katkenneita molekyylejä. Näin ollen, toisin kuin kannoilla WG44.1 ja JY1119 saatu CDM-ET, kannalla JY2141 saatu CDM-ET, joka sisälsi 2 % koliinikloridia, oli suhteellisesti ei-immunogenista silloinkin, kun se oli emulgoitu CFA:-han. Tämä tulos on yhtäpitävä sen tosiseikan kanssa, että 115 aminohaposta koostuva PspA:n N-päätteen kappale kannasta JY2141 ei ole kiinnittynyt pintaan[37], joten sen voidaan odottaa huuhtoutuvan pois ennen eluointia 2-prosenttisella koliinikloridilla.

Tutkimusten ulottaminen BALB/C-hiiriin vatsaontelon sisäistä altistamisreittiä käyttäen

Kaikissa edellä kuvatuissa tutkimuksissa käytettiin XID-geenivirheen ilmentävien CBA/N-hiirten altistamista laskimon sisäisesti. Näissä tutkimuksissa käytetty laskimon sisäinen reitti on bakteeriverisyyden ja verenmyrkytyksen tarkoituksenmukainen malli, mutta pneumokokkien LD_{50} on suurempi, kun niitä injektoidaan laskimon sisäisesti kuin vatsaontelon sisäisesti. CBA/N-hiiret ovat äärimmäisen herkkiä pneumokokki-infektiolle XIC-virheen seurauksena. Tämä geenivirhe estää niissä kiertävän, luonnostaan esiintyvän fosfokoliinivasta-aineen esiintymisen. On osoitettu, että näiden vasta-aineiden puuttumisen seurauksena nämä XID-hiiret ovat usean logaritmin verran herkempiä pneumokokeille kuin isogeeniset hiiret, joista tämä immuunivirhe puuttuu. Taulukossa 14 esitettyjen tulosten perusteella on kuitenkin selvää, että immunointi PspA:lla voi tuottaa suojan infektiota vastaan hiirissä, joista XID-virhe puuttuu, silloinkin, kun altistaminen tapahtuu vatsaontelon sisäisesti. Näin ollen ei ole mitään syytä epäillä, että esitetyt tulokset riippuvat välttämättä CBA/N XID-hiiren tai laskimon sisäisen antamisreitin käytöstä.

PspA on erittäin immunogeeninen

Näistä tutkimuksista saadaan ensimmäisiä kvantitatiivisia tuloksia puhdistetun FL-PspA:n siitä määrästä, joka tarvitaan suojaavan immuniteetin tuottamiseen hiirissä. Eristetty PspA näitä tutkimuksia varten saatiin käyttämällä hyväksi sitä seikkaa, että PspA:n C-päätteen puolikas sitoutuu solupinnan koliiniin[36]. Eristetty FL-PspA todettiin erittäin immunogeeniseksi hiiressä. Vain kaksi, 100 ng PspA:ta sisältävää injektiota ilman apuainetta tarvittiin suojan aikaansaamiseksi muuten kohtalokasta, kapselityyppiä 3 olevan *S. pneumoniae* -eliön annoksella, joka oli enemmän kuin 100 LD_{50}, aiheutettua verenmyrkytystä vastaan. Kun ensimmäinen injektio annettiin yhdessä apuaineen kanssa, niin niinkin pienet kuin 10 ng olevat annokset kykenivät tuottamaan suojaavan vasteen. PspA:n voimakas immunogeenisyys sekä mahdollisuus eristää PspA:ta koliini-Sepharose -pylväillä ovat osoituksia siitä, että PspA:ta voidaan käyttää rokotteena ihmisissä.

Suuri määrä julkaistuja [17, 29, 37] sekä julkaisemattomia tuloksia osoittaa, että PspA:n huomattavimmat, suojan tuottavat epitoopit sijaitsevat molekyylissä alfa-kierteisessä (N-päätteen) puolikkaassa. Esillä olevien tutkimusten perusteella on selvää, että immunointi N-päätteen kappaleilla, jotka sisältävät ensimmäiset 115 tai 260 amino-happoa 288 aminohaposta koostuvasta alfa-kierteisestä alueesta, voi tuottaa suojan yhdessä CFA:n kanssa annettaessa. Nämä kappaleet eivät kyenneet kuitenkaan tuottamaan suojaavia vasteita ilman CFA:ta. Sekä 115 että 260 aminohappoa käsittävien kappaleiden tapauksessa suojaavaa vastetta ei kyetty saamaan aikaan edes immunoimalla FL-PspA:n tapauksessa immunogeeniseen vähimmäisannokseen nähden 100-kertaisella annoksella. Tämä tulos on yhtäpitävä niiden aikaisempien tulosten kanssa, jotka tulokset osoittavat, että N-päätteen 245 aminohaposta [31, 37] koostuva kappale kykeni tuottamaan suojan muuten kohtalokasta pneumokokki-infektiota vastaan hiirissä, kun immunointi toteutettiin yhdessä CFA:n kanssa [32]. Tässä tutkimuksessa ei toteutettu immunointeja ilman CFA:ta. Vaikka PspA:n C-päätteen puoli ei ehkä sisälläkään tärkeitä, suojan aikaansaavia epitooppeja, se näyttää sisältävän sekvenssin, joka on tärkeä koko molekyylin immmunogeenisyydelle, koska täysipituinen molekyyli tuotti paljon voimakkaamman suojan kuin N-

päätteen kappaleet. C-päätteen puolikkaan vaikutus antigeenisyyteen voi johtua osittain siitä, että se kaksinkertaistaa immungeenin koon. PspA:n C-päätteen puolikkaan sisältävät molekyylit voivat myös olla erityisen immunogeenisiä, koska niiden tapauksessa kasautuminen on voimakkaampaa kuin mitä todetaan vain alfa-kierteisen alueen ilmentävien kappaleiden tapauksessa [38]. Proteiiniaggregaattien tiedetään yleisesti olevan antigeenisempia ja vähemmän tolerogeenisia (sietokykyä aikaansaavia) kuin yksittäisten vapaiden molekyylien[54].

PspA on huomattavin suojan tuottava komponentti pneumokokkiuutteissamme

Osoitus siitä, että PspA on pääasiallinen suojan tuottava komponentti CDM-ET-, CDM-CC -kasvatusalustassa sekä 2 % koliinikloridia sisältävissä eluaateissa, oli riippuvainen mutantti-pneumokokkien käytöstä, joilta pneumokokeilta puuttui kyky tuottaa FL-PspA:ta. Useamman kuin yhden *pspA*-mutanttikannan avulla varmistettiin, ettei kyvyttömyys saada aikaan suoja ilman FL-PspA:ta ollut näennäistulos jostakin muusta kuin PspA-mutaatiosta, joka salpasi jonkin toisen antigeenin tuotannon. Kannat WG44.1 ja JY1119 sisältävät samanlaisia häviämiä, jotka sisältävät *pspA*-geenien 5'-päät ja ulottuvat noin 3 kb:n verran ylävirran puolelle *pspA*-geenistä. WG44.1 on kapseloitumattoman Rx1-kannan mutantti ja JY1119 on saatu transformoimalla kapselityyppiä 3 oleva WU2-kanta WG44.1 pspA-mutaatiolla. Suojan kehittymistä ajatellen yksikään WG44.1- ja JY1119-kannoista saatu valmiste ei ollut yhtä tehokas kuin PspA+ -kannoista saadut valmisteet. Kantoja JY2141 ja LM34 käyttämällä haluttiin poissulkea se mahdollisuus, että PsaP+-kannoista peräisin olevilla valmisteilla aikaansaadun suojan olikin tuottanut jonkin sellainen ei-PspA-molekyyli, joka oli myös koodautunut WG44.1- ja JY1119-kantojen mutantti-pspA-geeneihin kytkeytyneeseen 3 kb:n häviämään [26, 37]. Näissä kannoissa Rx1 pspA-geeni on inaktivoitu istutteen avulla siten, että ne on saatu tuottamaan vastaavasti 115 ja 245 aminohaposta koostuvia N-päätteen kappaleita. Näissä kannoissa ei ole muita tunnettuja mutaatioita. Vaikka Rx1 ja R36A ovatkin hyvin toistensa kaltaisia kapseloitumattomia kantoja, niin eräissä tutkimuksissa käytettiin kuitenkin PspA+-vertailuna Rx1-kantaa, koska se on kantojen WG44.1, LM34 ja JY2141 isogeeninen kumppani. Kantojen JY2141 ja LM34 tuottamista N-päätteen kappaleista puuttuu

pinta-ankkuri ja ne erittyvät alustaan [36]. Kannan JY2141 2 % koliinikloridia sisältävät eluaatit eivät tuottaneet suojaa edes apuaineen läsnäollessa. Kannasta JY2141 peräisin oleva CDM-ET ei tuottanut suojaa ilman apuainetta. LM34 testattiin ilman CFA:ta vain kolmessa hiiressä, mutta sillä saadut tulokset olivat yhtäpitäviä kannalla JY2141 saatujen tulosten kanssa.

Tunnettua on, että kapselia vastaan kohdistuneet vasta-aineet suojaavat pneumokokkiinfektiota vastaan [5, 19]. Näissä tutkimuksissa on kuitenkin epätodennäköistä, että niillä olisi jotakin osuutta siihen suojaan, jonka PspA:n oletetaan saaneen aikaan. Altistamiseen käyttämämme kanta käsittää tyypin 3 kapselipolysakkaridia ja pääasiallinen PspA-lähteemme oli R36A-kanta, joka on kapselityyppiä 2 olevan kannan spontaani kapseloitumaton mutantti [39, 41]. Jokin aika sitten on osoitettu, että R36A-kannan pinnalta tai sen sytoplasmasta puuttuu ilmaistava tyypin 3 kapseli[55]. Edelleen, useimmissa näistä tutkimuksista käytetyt CBA/N-hiiret eivät kykene tuottamaan vasta-ainevastetta tyyppiä 3 olevalle polysakkaridille [56].

Suojaavat ei-PspA-komponentit

Sen havainnon, että WG44.1-kannan CDM-CC- ja CDM-ET -supernatantit kykenevät tuottamaan suojan, kun niitä injektoidaan suurina määrinä yhdessä apuaineen kanssa, perusteella voidaan olettaa, että nämä supernatantit sisälsivät ainakin hyvin pieniä määriä PspA:sta poikkeavia, suojan tuottavia molekyylejä. 2 % koliinikloridia sisältävällä liuoksella elävien pestyjen pneumokokkien pinnalta eluoitua PspA:ta sisältävien valmisteiden tapauksessa ei saatu mitään osoitusta muista suojan tuottavista komponenteista kuin PspA, mikä johtuu todennäköisesti siitä, että alustaan vapautuneet, suojan tuottavat muut kuin PspA-proteiinit poistuivat valmisteesta aikaisemmassa huuhteluvaiheessa. WG44.1-supernatantissa läsnä olevia, suojan tuottavia molekyylejä ei tunneta. Tässä suhteessa mielenkiintoista on se, että kannasta R36A poiketen kannan Rx1 on osoitettu sisältävän hyvin pienen määrän sytoplasmista tyypin 3 polysakkaridia (mutta siitä puuttuu täydellisesti tyyppiä 3 oleva pintapolysakkaridi [55]). Tämä ero Rx1-kantaan nähden syntyi ilmeisesti niissä geneettisissä manipuloinneissa, joita käytettiin, kun kanta Rx1 muodostettiin kannasta

R36A[39, 41]. Niinpä kannasta Rx1 tai sen tytärkannoista WG44.1, LM34 tai JY2141 valmistetut valmisteet voivat mahdollisesti sisältää pieniä määriä kapselipolysakkaridia. Kuitenkin monista syistä hyvin epätodennäköiseltä näyttää se, että näissä tutkimuksissa tunnistettu, PspA:sta eroava, suojan aikaansaava materiaali oli tyyppiä 3 oleva kapselipolysakkaridi (jota altistava WU2-kanta on ilmentänyt): 1) näitä kantoja ei kasvatettu CDM-CC- eikä CDM-ET -alustalla, jotka molemmat estävät autolysiinin aktiivisuuden ja hajoamisen [57], joka on välttämätön tyyppiä 3 olevan polysakkaridin pienten määrien vapautumiseksi Rx1-kantajoukon sytoplasmasta; 2) CBA/N-hiirissä kehittyi suojaavia vasteita PspA:sta poikkevaille antigeeneille, mutta ne ilmentävät XID-tyyppistä immuunivasteen puutetta, joka sallii proteiinivasteet, mutta salpaa useampia polysakkarideja, mukaan lukien tyyppiä 3 olevat kapselipolysakkaridit [56], vastaan kehittyvät vasta-aineet [46]; ja 3) PspA:sta poikkeavan komponentin immunogeenisyys edellytti CFA:n käyttöä, joka on apuaine, jonka tiedetään kiihottavan T-riippuvia (proteiinin tuottama) vasta-ainevasteita eikä T:stä riippumattomia (polysakkaridin tuottamia) vasta-ainevasteita.

Lukuisia, PspA:sta poikkeavia, suojan tuottavia pneumokokkiproteiineja on tunnistettu, kuten pneumolysiini, autolysiini, neuramidaasi ja PspA, joiden koko on vastaavasti 52, 36,5, 107 ja 37 kDa [21, 58, 59, 60]. Tässä mainitut, PspA:sta poikkeavat, suojan aikaansaavat komponentit saattavat koostua näiden ja/tai muiden tunnistamattomien proteiinien seoksesta. Yritykset tunnistaa sellaisia lambda-klooneja, jotka tuottavat PspA:sta poikkeavia, suojan tuottavia proteiineja, jotka ovat yhtä tehokkaita kuin PspA, eivät ole olleet onnistuneita[25].

<u>PspA:n eristäminen</u>

CDM-CC- ja CDM-ET -alustan sekä materiaalin, joka saatiin eluoimalla elävistä soluista 2 % koliinikloridiliuoksella, suojaava kyky oli samankaltainen ajatellen sen alkuperäisen viljelmän, josta injektoitu annos oli peräisin, tilavuutta. Pääasiallinen etu, johon päästään eluoimalla PspA pneumokokkien pinnalta 2 % CC-liuoksella, on se, että pneumokokkeja voidaan kasvattaa millä tahansa tavanomaisella kasvatusalustalla, eikä niitä tarvitse ensin totutella määriteltyyn alustaan. Lisäksi PspA:n väke-

võinti voidaan toteuttaa sentrifugoimalla pneumokokit ennen PspA:n eluointia. Joko CDM-CC- tai CDM-ET -alustan käyttöön liittyy se etu, että nämä alustat estävät hajoamisen ja pneumokokit voidaan kasvattaa stationäärivaiheeseen ilman, että valmisteet kontaminoituisivat sytoplasman sisällöllä tai kalvo- ja soluseinämäkomponenteilla. CDM-ET -kasvatusalustan erityinen etu on se, että koska se ei sisällä suuria pitoisuuksia koliinia, niin sen sisältämä PspA voidaan adsorboida suoraan koliini-Sepharose -pylvääseen affiniteettipuhdistusta varten.

Yksi litra CDM-ET -kasvatusalustaa sisältää noin 400 μg PspA:ta, ja me kykenimme eristämään siitä noin 3/4 hyvin puhtaaksi. Kun käytetään 0,1 μg:n annosta, niin litra CDm-ET-alustaa sisältää riittävästi PspA:ta noin 4000 hiiren tai mahdollisesti 40-400 ihmisen immunoimiseksi. Tällä hetkellä käyttämämme panoskoko yhtä pylväsajoa kohden on vain 300 ml CDM-ET -alustaa. Tätä määrää voidaan oletettavasti suurentaa suurentamalla absorptiopinnan määrää siten, että pylvään halkaisijaa suurennetaan. Tämän hetkistä ajopuskuria käyttäen olemme todenneet, että optimaalinen oli 0,5 cm oleva koliini-Sepharose-hartsin syvyys; suurentaminen arvoa 0,5 cm suuremmaksi johti kokonaissaannon pienenemiseen, ei sen suurenemiseen, siinäkin tapauksessa, että käytettiin R36A CDM-ET -alustan suurempaa kuormaa.

Taulukko 8 - Pneumokokkikannat

Kanta	Kapselityyppi	Ilmentynyt PspA	Lähtö-kanta	Muodotus-tekniikka	Viitteet
D39	2	täysipituinen	-	kliininen eriste	26, 44
R36A	kapseloitumaton	täysipituinen	D39	kapseloitumaton mutantti	23, 44, 45
Rx1	kapseloitumaton	täysipituinen	R36A	peärisin kannasta R36A	26, 39, 41
WG44.1	kapseloitumaton	puuttuu	Rx1	poikkeava aktivointi istuttamalla pKSD300	26, 37
LM34	kapseloitumaton	Rx1[a]:n aa-1-245	Rx1	inaktivointi istuttamal-la pKSD300	26,37, 42
JY2141	kapseloitumaton	Rx1[a]:n aa-1-115	Rx1	inaktivointi istuttamal-la pJY4208	37
WU2	3	täyspituinen	-	kliininen eriste	25, 46
JY119	3	puuttuu	WU2	transformointi WG44.1 DNA:lla	37
A66	3	täysipituinen	--	kliininen eriste	44, 47

[a] LM34 ja LY2141 ilmentävät kappaleita, jotka sisältävät vastaavasti Rx1 PspA:n ensimmäiset 245 ja ensimmäiset 115 aminohappoa.

Taulukko 9 - PspA on pääasiallinen suojan tuottava komponentti kolmella eri menetelmällä saaduissa antigeenivalmisteissa

Valmiste	Kanta (PspA status)	Annos alustan tilavuutena, µl*	Vrk, jolloin elossa, mediaani	Elävät: kuolleet	P vertailuihin nähden[b]
2 % CC:ta sisältävä eluaatti elävistä soluista	R36A (PspA*)	1000	>21	2:0	
		200	>21	2:0	
		20	>21	2:0	
		2	>21	0,2	
		kaikki R36S	>21	6:2	0,03
	JY2141 (PspA*)	1000	3,>21	1:1	
		200	1	0:2	
		20	1	0:2	
Kirkastettu CDM-ET- alusta	Rx1 (PspA*)	100	>21	9:0	<0,0001
		30	>21	2:0	
		10	2	1:2	
		3	2	0:3	
		kaikki	2,>21	12.6	0,0004
	LM34	100	2,2,>21	1:2	
	WG44.1 (pspA*)	100	2	0:9	
		30	2	0:3	
		10	2	0:3	
		4	2	0:3	
	WU2 (pspA*)	1000	>21	3:0	0,05
		100	>21	1:0	
		kaikki	>21	4:0	0,03
	JY1119 (pspA*)	1000	4	0:3	
	CDM-CC	100	2	0:2	
Kirkasetttu CDM-ET -alusta	R36A (pspA*)	100	>21	8:0	<0,0001
		10	3,>21	5:5	0,004
		1	1,5	3:5	
		0,1	2	0:2	
		kaikki	>21	16:12	0,006
	JY2141 (aa1-115)	100		0:2	
		10	1,5	0:2	
			1,5		
	WG44.1 (pspA*)	100		0:2	
		10	3	0:2	
			1,5		
Puuttuu	-			0:14	-
			2		

a Antigeeniannos on esitetty kasvatusalustan, josta 0,1 ml injektoitua materiaalia oli saatu, tilavuutena. Jokaiseen hiireen injektoitiin kaksi esitettyä, vatsaontelon sisäistä annosta, jotka oli laimennettu tarvittavalla tavalla laktatoidulla Ringer:in injektioliuoksella.

b Vertailut, joita käytettiin tilastolliseen vertailuun: 2 % CC, kaikki JY2141; CDM-CC Rx1, kaikki WG44.1; CDM-CC WU2, JY2141 + kaikki JY2141.

Taulukko 10 - PspA:n eristäminen 300 ml:sta CDM-ET-alustaa R36A- tai WG44.1-pneumokokkien kasvatuksen jälkeen [a]

	R36A				WG44.1		
Fraktio	µg proteiinia/ml	proteiinien kokonais-määrä, µg	suurin käänteinen dot blot[c]	dot blot yksiköt[b],[c] yhteensä	µg proteiinia/ml	proteiinien kokonais-määrä/ml	suurin käänteinen dot blot[c]
kasvatusalusta	13,3	3,990	4	1200	13,7	4,110	<1
läpivirtaama	13,6	4,080	1	300	13,5	4,050	<1
1. huuhtelu			<1				<1
10. huuhtelu			<1				<1
1. eluutio	26	78	256	770	<1	-	<1
2. eluutio	2	6	16	48	<1	-	<1
3. eluutio	<1	-	4	12	<1	-	<1
eluoitu yhteensä		84		830		-	<1

a Pylvääseen kaadettiin 300 ml kirkastettua CDM-ET-alustaa R36A:n tai WG44.1:n kasvatuksen jälkeen. Pylväs pestiin 10 kertaan peräkkäin kulloinkin 3 ml:n TBA-annoksella. Eluointi toteutettiin TBA:lla + 2 % CC.

b Proteiinin kokonaismäärä, µg, tai dot blot -yksiköiden kokonaismäärä kuvaa kokonaismäärää 300 ml:ssa pylvääseen kaadettua materiaalia tai 3 ml:n kokoisissa eluoiduissa fraktioissa.

c MAb XiR278 käytettiin immuunitäplissä PspA:n ilmaisemiseksi dot blot -täplistä.

d Dot blot -yksiköt laskettiin kertomalla täplien tiittereiden käänteisluku tilavuudella millilitroina.

Taulukko 11 - Puhdistettu täysipituinen PspA kykenee tuottamaan suojan kohtalokasta verenmyrkytystä vastaan hiirissä

Antigeeni	Annos[a]	Apuaine tai laimennin	Anti-PspA tiitteri[b] (Log. keskiarvo ± S.E.)	Altistus $10^{5,1}$ WU2-eliölle			Altistus $10^{4,2}$ A66-eliölle		
				Elävät: kuolleet	Vrk, jolloin elossa, mediaani	P vs yhdistetty vertailu	Elävät: kuolleet	Vrk, jolloin elossa, mediaani	P vs yhdistetty vertailu
R36A (PspA*)	1 µg	Ringer's	3,3 ± 0,2	5:0	>21	0,015	2:3	4	0,002
	0,01	Ringer's	2,6 ± 0,2	4:0	>21	0,041	1:4	4	0,0032
	0,01	Ringer's	2,7 ± 0,2	1:4	4	n.s.	0:5	3	0,0058
	1 µg	CFA	3,5 ± 0,2	5:0	>21	0,027	3:2	>21	0,0012
	0,1	CFA	3,6 ± 0,1	5:0	>21	0,013	2:3	4	0,0012
	0,01	CFA	3,1 ± 0,2	4:1	>21	0,015	0:5	3	0,0058
WG44.1 (PspA)	3600 µl	Ringer's	<1,6	n.d.	n.d.		1:4	3	n.s.
	360	Ringer's	<1,6	n.d.	n.d.		0:5	2	n.s.
	36	Ringer's	<1,6	n.d.	n.d.		0:5	2	n.s.
	3600 µl	CFA	<1,6	n.d.	n.d.		0:5	2	n.s.
	360	CFA	<1,6	n.d.	n.d.		1:4	2	n.s.
	36	CFA	<1,6	n.d.	n.d.		0:5	2	n.s.
suolaliuos	-	CFA	<1,6	1:5	4	--	n.d.	n.d.	-
yhdistetyt vertailut			<1,6	1:5	4		2:28	2	-

a Taulukossa 2 esitettyihin tuloksiin vertaamiseksi tulisi huomata, että 1, 0,1 ja 0,01 µg:n annokset oli saatu 3600, 360 ja 36 µl:sta R36A:n kasvatusalustaa. Kannasta WG44.1 peräisin olevan PspA-eluaatin samanlaisia laimennuksia injektoitiin vertailuna. Injektoitujen WG44.1-valmisteiden määriksi on esitetty 3600, 360 ja 36 µl ja ne vastaavat sen alkuperäisen kasvatusalustan tilavuutta, josta WG44.1-annokset oli valmistettu.

b Vasta-ainearvot on esitetty ELISA-tiittereiden käänteislukuina.

c P-arvot on laskettu Wilcoxon:in kahden näytteen järjestystestillä. Kruskal-Wallis:in ei-parametrisellä ANOVA-menetelmällä WU2-altistus oli merkittävä arvolla P = 0,01, A66-merkittävyys oli P<0,0001.

Taulukko 12 - Rx1 PspA:n 29 kDa:n suuruinen N-päätteen kappale on injektoitava yhdessä apuaineen kanssa suojan tuottamiseksi WU2:ta vastaan

29 kDa PspA, μg	Apuaine tai laimennin	Vuorokaudet, jolloin elossa, mediaani	Elävät:kuolleet	P vs. ilman[b]
30	CFA	>21	3:0	0,0006
3	CFA	>21	3:0	
30	Ringer's	2	0:3	
3	Ringer's	2	1:2	
puuttuu	CFA	2	0:7	
puuttuu	Ringer's	2	0:7	

a Tämä 29 kDa:n kappale käsittää PspA:n ensimmäiset 260 aminohappoa.

b P-arvojen laskemiseksi 30 μg:lla ja 3 μg:lla saadut tiedot yhdistettiin; PspA:lla + CFA:lla immunoituja hiiriä verrattiin CFA-vertailuihin; PspA:lla + Ringer:in liuoksella immunoituja hiiriä verrattiin vertailuihin, jotka oli immunoitu Ringer:in liuoksella. Ainoastaan tilastollisesti merkittävät P-arvot on esitetty. PspA + CFA-yhdistelmän laskettu P-arvo pelkkään CFA:han nähden oli 0,0006 sekä Wilcoxon:in kahden näytteen järjestystestillä että Fisherin täsmätestillä määritettynä.

Taulukko 13 PspA ei ole ainoa suojan tuottava molekyyli, joka on saatu vapautumaan pneumokokeista häiritsemällä sitoutumista pneumokokkien pinnalla olevaan koliiniin

Valmiste	Kanta (PspA)-tila	Annos (tilavuutena yksikössä μl)	Vrk, jolloin elossa, mediaani	Elävät: kuolleet	P-arvot[a]
					P vs. kaikki JY2141
2 % CC-eluaatti elävistä soluista	R36A (PspA*)	1000	>21	2:0	0,02
		200	>21	5:0	0,02
		20	>21	5:0	0,02
		2	>21	5:0	0,001
		kaikki R36A	>21	17:0	
	JY2141 (aa-1-115)	1000	>21	2:0	
		200	1	0:2	
		20	1	0:2	
		2	1	0:2	
		kaikki JY2141	1	2:6	
					P vs. yhd.vertailut
kirkastettu CDM-CC alusta + CFA	Rx1 (PspA$^+$)	1000	>21	3:0	0,002
		100	>21	3:0	0,002
	WU2 (PspA$^+$)	1000	>21	3:0	0,002
		100	>21	3:0	0,002
		3	>21	3:0	0,002
	WG44.1 (PspA)	1000	>21	5:1	<0,0001
		100	2,5	2:4	0,002
	JY1119 (PspA)	1000	>21	3:0	0,002
		100	>21	3:0	0,002
Kirkastettu CDM-ET-alusta + CFA	R36A (PspA$^+$)	1000	>21	3:1	0,004
		10	>21	4:0	0,004
		1	>21	3:1	0,004
		0,2	2	0:4	
	JY2141 (aa 1-115)	10	>21	2:0	
		1	>21	2:0	
	kaikki JY2141	-	>21	4:0	0,004
	WG44.1 (PspA)	100	>21	2:0	
Pelkkä CDM-ET		10	2	0:2	
Puuttuu	vertailut[b]		2	0:9	
			1,5	0:4	
Yhdistetyt			2	0:13	

a Niissä tapauksissa, joissa ei saatu tilastollisesti merkittäviä tuloksia, P-arvoa ei ole esitetty.

b Käsitteellä Yhdistetyt vertailut viitataan tietoihin, jotka on esitetty kohdassa "pelkkä CDM-ET" sekä "puuttuu".

Taulukko 14 BALB/c-hiirten immunointi eristetyllä PspA:lla saa aikaan suojan *S. pneumoniae* WU2-kantaa vastaan

Antigeeni		Apuaine	Altistus		Vrkt:t ennen	P vs vrt.
Lähde	Annos[a]	tai laimennin	Log CFU	Antamisreitti	kuolemaa	TRS/FE[b]
R36A (PspA$^+$)	1 μg	CFA	4	l.p.	2, >21, >21, >21	0,06./0,03
WG44.1 (PspA)	100 μl	CFA	4	l.p.	2,3	
Ei yhtään	-	CFA	4	l.p.	2,2,2,4	
R36A (PspA$^+$)	1 μg	ei yhtään	6	i.v.	2, >21, >21, >21	0,06./0,03
WG44.1 (PspA)	100 μl	ei yhtään	6	i.v.	5,7	
Ei yhtään	-	ei yhtään	6	i.v.	2,2,2,3	
Yhdistetyt i.v. ja l.p. tulokset					i.v. tai l.p.	0,008/0,007

[a] R36A PspA:n annos, 1 μg, eristettiin 100 μl:sta CDM-ET-alustaa. Vertailuhiiriin injektoitiin vastaava tilavuus koliinipylvään poistetta, joka oli peräisin PspA$^-$ WG44.1-kannan PspA:n vale-eristyksestä. WG44.1-materiaalin annos on esitetty 100 μl:ksi, koska tämä on se CDM-ET-tilavuus, josta injektoitu pylvään poiste oli peräisin.

[b] P-arvot on laskettu Wilcoxon:in kahden näytteen järjestystestillä, TSR, tai Fisher:in täsmätestillä, FE yhdistettyjen vertailujen suhteen kussakin ryhmässä. "Yhdistetyt vertailut" sisältävät tuloksia, jotka on saatu injektoimalla "WG44.1":tä ja "puuttuu". I.p.- ja i.v.-tutkimukset

Esimerkki 4 - Näyttö kahden PspA:n samanaikaisesta ilmentymisestä

Southern Blot -analyysin perusteella pohditaan, onko useimmissa *S. pneumoniae* -eristeissä kaksi sellaista DNA-sekvenssiä, jotka hybridisoituvat sekä Rx1 pspA:n 5'-puolikkaaseen että 3'-puolikkaaseen, vai onko kysymyksessä Southern blot -määrityksen aiheuttama harha. Kun bakteerihajotteita on tutkittu Western blot -määrityksellä, niin tulokset ovat olleet aina yhtäpitäviä sen tilanteen kanssa, että kukin eriste tuottaa vain yhtä PspA:ta. Tämä esimerkki osoittaa ensimmäisen kerran, että sama eriste voi ilmentää samanaikaisesti kahta PspA:ta, jotka eroavat toisistaan näennäisen molekyylipainonsa ja serotyyppinsä suhteen.

Eri PspA-molekyyleissä on usein yhteisiä ristireaktiivisia epitooppeja, ja yhden PspA:n vaikutuksesta kehittynyt immuuniseerumi kykeni tunnistamaan kaikkien pneumokokkien PspA:n. Näistä samankaltaisuuksista huolimatta eri kantojen PspA:t voidaan yleensä erottaa toisistaan niiden molekyylipainon ja niiden sekä erilaisten PspA-spesifisten monoklonaalisten vasta-aineiden (MAb) välisen reaktiivisuuden perusteella.

Järjestelmä PspA:n serotyypin määrittämiseksi on kehitetty, jossa järjestelmässä käytetään seitsemästä MAb:sta koostuvaa joukkoa. PspA-serotyypit on nimetty immuunitäplien ja tämän MAb-joukon välisen positiivisen tai negatiivisen reaktiivisuuden perusteella. 31 PspA-serotyyppiä todettiin 57 itsenäisen, 9 erilaista kapseliryhmää/tyyppiä olevan eristeen joukossa. PspA-molekyylien huomattava vaihtelevuus osoitettiin myöhemmässä tutkimuksessa, jossa käytettiin 51 Alaskasta peräisin olevaa, 6B-kapseliserotyyppiä olevaa eristettä, jotka oli saatu tutkijalta Alan Parkinson tutkimuslaitoksesta Arctic Investigations Laboratory of the Centers for Disease Control and Prevention. Näiden 51 6B-kapselityyppiä olevan eristeen joukossa todettiin olevan 22 erilaista PspA:ta PspA-serotyypin ja PspA:n molekyylipainon vaihtelun perusteella.

Useimmissa pneumokokkikannoissa näyttää olevan kaksi DNA-sekvenssiä, jotka ovat homologiset sekä pspA:n 5'- että sen 3'-puolen kanssa, mutta Rx1:n kohdennetusti

katkaistut mutaatit ovat kuitenkin paljastaneet, että yksi niistä, pspA, koodaa PspA:ta. Toista sekvenssiä kutsutaan toistaiseksi pspA:n kaltaiseksi sekvenssiksi. Tällä hetkellä ei tiedetä, tuottaako pspA:n kaltainen sekvenssi geenituotteen. Näyttöä siitä, että pspA-geeni ja pspA:n kaltainen geeni ovat homologisia mutta erillisiä alleeliryhmiä, saadaan Southern blot -analyysista käyttämällä hyvin ehdottomia olosuhteita. Lisänäyttöä siitä, että pspA-geeniasema ja pspA:n kaltainen geeniasema ovat erilliset, saadaan tutkimuksista, joissa käytettyjen PCR-alukkeiden avulla 70 prosentista pneumokokeista voidaan monistaa vain yksi, kooltaan noin 2 kD oleva tuote. Jäljellä olevissa 30 %:ssa pneumokokeista käyttyjen alukkeiden ei todettu saavan aikaan monistumista.

Kahden PspA:n osoittaminen

Kun MC25-28 -kantoja tutkittiin näiden seitsemän, eri PspA-epitooppien suhteen spesifisen MAb:n avulla, niin kaikilla neljällä kannalla saatiin samat reaktiivisuuskuviot (kuvio 4). MAb-vasta-aineet XiR278 ja 2A4 ilmaisivat PspA-molekyylin, jonka näennäinen molekyylipaino oli 190 kDa jokaisessa eristeessä. Edellä kuvatun, PspA-serotyypin määrittämiseksi käytetyn järjestelmän mukaisesti tästä 190 kDa:n molekyylistä käytettiin nimitystä PspA tyyppi 6, koska se on reaktiivinen XiR278:n ja 2A4:n kanssa, muttei kuitenkaan viiden muun tässä määritysjärjestelmässä käytetyn MAb-vasta-aineen kanssa. Jokainen eriste tuotti myös toisen PspA-molekyylin, jonka näennäinen molekyylipaino on 82 kDa. Tämä 82 kDa:n suuruinen, kustakin eristeestä saatu PspA ilmaistiin vain MAb-vasta-aineella 7D2, ja sitä kutsuttiin tyypiksi 34. Reaktiivisuutta ei todettu MAb-vasta-aineiden Xi126, Xi64, 1A4 eikä SR4W4 kanssa. Se tosiseikka, että kaikki neljä kapseli-6B -kantaa ilmentävät kahta PspA:ta, perustui sekä molekyylipainoihin että PspA-serotyyppeihin, minkä perusteella voidaan päätellä, että ne saattavat olla saman kloonin jäseniä.

Kummankin PspA:n samanaikainen tuottaminen

Pesäkkeiden immuunitäplistä saadut tulokset osoittivat, että kumpikin PspA oli läsnä samanaikaisesti näiden eristeiden jokaisessa pesäkkeessä, kun kasvattaminen tapahtui

in vitro. Kaikki alkuperäisen viljelmän kullakin maljalla olevat pesäkkeet sekä kaikki vain yhdestä pesäkkeestä saadut jälkeläispesäkkeet reagoivat MAb-vasta-aineiden XiR278, 2A4 ja 7D2 kanssa.

pspA-geenien lukumäärä

Eräs selitys tähän toiseen PspA-molekyyliin oli se, että nämä kannat sisälsivät ylimääräisen *pspA*-geenin. Koska useimmat kannat sisältävät *pspA*-geenin ja *pspA*:n kaltaisen geenin, niin oli odotettavaa, että mikäli läsnä oli ylimääräinen geeni, niin tällöin MC25-28-eristeissä havaitaan vähintään kolme *pspA*-homologista geenialuetta. Kaikkien MC25-28 -eristeiden HindIII-pilkkeissä todettiin 7,7 ja 3,6 kb:n vyöhyke, kun koettimena käytettiin muodostetta pLSM*pspA*13/2 (kuvio 5A). Sitä vastoin, kun Rx1 DNA pilkottiin entsyymillä Hind III ja hybridisoitiin muodosteeseen pLSM*pspA*13.2, niin homologisia sekvenssejä todettiin 9,1 ja 4,2 kb:n kappaleissa, mikä oli odotettavaa aikaisempien tutkimusten perusteella (9) (kuvio 5A). Tuloksia, joiden perusteella MC25-28 -muodosteissa on vain kaksi *pspA*-homologista geeniä, saatiin myös pilkkomalla neljällä muulla entsyymillä (taulukko 15).

Aikaisemmissa tutkimuksissa on esitetty, että *pspA*:n 5'-puolta (johon on koodautunut proteiinin alfa-kiertenen puolikas) varten tarkoitetut koettimet sitovat useimpien kantojen *pspA*-kaltaisen sekvenssin vain noin 90 % olevalla ehdottomuudella. MC25-28-eristeiden kromosomipilkkeiden tapauksessa todettiin, että muodosteen pLSM*pspA*12/6 5' Rx1-koetin sitoi molemmat *pspA*-homologiset vyöhykkeet yli 95 % olevalla ehdottomuudella. Tämä sama koetin sitoi vain Rx1-kappaleen sisältävän *pspA*:n yli 95 % olevalla ehdottomuudella (kuvio 5B).

PspA-geenin tunnusomaisia piirteitä selvitettiin edelleen kustakin kannasta saadun, PCR-monistetun *pspA*:n RFLP-analyysilla. Koska aikaisemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että yksittäiset kannat tuottivat vain yhtä tuotetta, ja koska monistaminen toteutetaan tunnettuun *pspA*-sekvenssiin perustuvilla alukkeilla, niin todennäköiseltä näyttää se, että kussakin tapauksessa monistuneet tuotteet edustavat *pspA*-geeniä eikä *pspA*:n kaltaista geeniä. Kun MC25-28 -eristeet käsiteltiin tällä tavalla, niin kussakin

tapauksessa muodostui 2,1 kb:n suuruinen monistunut *pspA*-tuote. Hha1-entsyymillä pilkottaessa kullakin entsyymillä saatujen kappaleiden yhteinen koko oli suurin piirtein sama kuin 2,1 kb:n monistuneella tuotteella (kuvio 6). Näiden tulosten perusteella voidaan olettaa, että 2,1 kb:n monistunut DNA edustaa vain yhden DNA-sekvenssin monistunutta tuotetta. Sitä vastoin Rx1 tuotti 2,0 kb:n monistuneen tuotteen sekä entsyymillä Hha1 pilkottaessa viisi kappaletta, joiden koot olivat 0,76, 0,468, 0,390, 0,349 sekä 0,120, mikä oli odotettavaa sen tunnetun *pspA*-sekvenssin perusteella.

Nämä neljä tässä esimerkissä tutkittua eristettä ovat ensimmäiset eristeet, joissa on todettu kiistatta kaksi PspA:ta. Se tulkinta, että yksi ainoa pneumokokkieriste ilmentää samanaikaisesti kahta PspA:ta, perustuu siihen havaintoon, että erilaiset, PspA:ta vastaan kohdistuvat MAb-vasta-aineet ilmaisevat vyöhykkeitä, joilla on eri molekyylipaino. Tässä tutkimuksessa käytetyt eristeet olivat peräisin ryhmästä, joka oli alun perin valittu Brian Spratt:in tutkimusta varten, koska ne kykenevät sietämään penisilliiniä. Hyvin todennäköistä on se, että nämä kaikki neljä eristettä, jotka tuottavat kahta PspA:ta, ovat toistensa kaltaisia, koska niille on yhteistä PspA-serotyyppi, monistuneet *pspA* RFLP:t, kromosomaaliset *pspA* RFLP:t, kapselityyppi sekä kyky sietää penisilliiniä.

Ohessa esitettyjen tutkimusten, jotka osoittavat kahden PspA:n olemassaolon näissä neljässä kannassa MC25-28, tulkitsemisessa on otettava huomioon se, mitä tiedetään PspA:n serologiasta Western blot -määritysten perusteella. Aiemmin on esitetty, että eri kantojen PspA-proteiinien näennäiset molekyylipainokoot ovat alueella 60—200 kDa Western blot -määrityksen perusteella. Tämä kokojen erilaisuus johtuu vähintään osittain toissijaisesta rakenteesta. Jopa vain yhdestä eristeestä peräisin olevan PspA:n tapauksessa todetaan yleensä useita, eri kokoja vastaavia vyöhykkeitä. Mutaatio- ja immunokemialliset tutkimukset ovat kuitenkin osoittaneet, että kaikki Rx1:stä peräisin olevat erikokoiset PspA-vyöhykkeet ovat vain yhden, 69 kD:n proteiinia koodaavan geenin tuottamia. Vain yhden kannan tuottaman PspA:n Western-täplien vyöhykekoon heterogeenisyys näyttää johtuvan sekä hajoamisesta että polymeroitumisesta.

PspA määriteltiin alunperin käänteiseen absorptioon perustuvilla tutkimuksilla, jotka osoittivat, että joukko Rx1:n pintaproteiineja vastaan vaikuttavia MAb-vasta-aineita reagoi kulloinkin jonkin proteiinin kanssa, ja myöhemmin tutkimuksilla, joissa käytettiin erilaisia katkenneita PspA-muotoja ilmentäviä Rx1- ja WU2-johdannaisia. Kummassakin tapauksessa oli selvää, että jokainen tietyn kannan PspA:ta vastaan vaikuttava MBa reagoi saman proteiinin kanssa. Tällaisia yksityiskohtaisia tutkimuksia ei olla toteutettu kaikilla ihmiseristeillä, joita on useita satoja. Mahdollista on se, että eräiden eristeiden tapauksessa MAb-vasta-aineiden ja kahden PspA:n välinen reaktiivisuus on saattanut jäädä huomaamatta. Näin on voinut tapahtua, mikäli kaikki reaktiiviset vasta-aineet tunnistivat saman eristeen kummankin PspA:n tai jos näiden kummankin PspA:n kaikkein huomattavimmat liikkuneet vyöhykkeet liikkuivat yhdessä. MC25-28 -eristeiden tapauksessa havainto kahdesta PspA:sta oli mahdollinen, koska selvästi erottuvat vyöhykkeet, joilla oli erilainen molekyylipaino, suosivat reaktiota eri MAb-vasta-aineiden kanssa.

Hakijat pitävät enemmän siitä tulkinnasta, että kukin MC25-28 -eriste tuottaa kahta PspA:ta, koska vaihtoehtoinen mahdollisuus vaikuttaa epätodennäköiseltä, eli se tilanne, että MAb-vasta-aineiden XiR278 ja 2A4 tunnistama 190 kDa:n PspA saattaa olla MAb-vasta-aineen 7D2 tunnistaman, 84 kDa:n suuruisen monomeerin dimeeri, mikäli näiden erilaisten MAb-vasta-aineiden tunnistamat epitoopit olivat riippuvaisia joko proteiinin dimeerisestä tai sen monomeerisestä tilasta, sillä aina kun MAb reagoi jonkin kannan PspA:n kanssa, MAb-vasta-aine tunnistaa tavallisesti sekä monomeerisen että dimeerisen muodon. Mitään muita sellaisia eristeitä ei olla löydetty, joiden eristeiden tapauksessa jotkut MAb:t tunnistaisivat vain PspA:n näennäisen dimeerisen muodon, kun taas toiset vasta-aineet tunnistaisivat vain sen monomeerisen muodon.

Useita mahdollisia selityksiä saattaa olla sille, ettei useimpien kantojen tuottamaa kahta PspA:ta kyetä toteamaan. 1) kaikki pneumokokit saattavat tuottaa kahta PspA:ta viljelmässä, mutta MAb-vasta-aineet tunnistavat yleensä vain yhden niistä (tässä eristeessä *pspA* DNA ja *pspA*:n kaltainen geenialue ovat kenties yhdistyneet uudestaan, jolloin tämä geeni tuottaa PspA:ta vastaan vaikuttavan MAb:n tunnista-

man tuotteen). 2) Kaikissa pneumokokeissa voi olla kaksi *pspA*:ta, mutta yksi niistä ei ilmenny in vitro-kasvatusolosuhteissa. 3) *PspA*:n kaltainen geeni on tavallisesti toimintakyvytön näennäisgeenisekvenssi, joka on jostakin selittämättömästä syystä muuttunut toimintakykyiseksi näissä eristeissä.

Epätodennäköiseltä näyttää se, että vain yhden PspA:n ilmentyminen useimmissa kannoissa johtuu vaihesiirrosta, joka sallii vain joko *pspA*-geenin tai *pspA*:n kaltaisen geenin ilmentymisen tietyllä ajanhetkellä, koska monet tutkitut kannat tuottavat toistuvasti ja yhtäpitävästi yhtä ja samaa PspA:ta. MC25-28-kantojen tapauksessa kahden PspA:n ilmaantuminen ei ilmeisestikään johdu vaihesiirrosta, sillä yksittäiset pesäkkeet tuottavat sekä tyypin 6 että tyypin 34 PspA:ta.

Oletettavaa on, että näissä neljässä kannassa *pspA*:n kaltainen DNA-sekvenssi tuottaa toista PspA-proteiinia. PspA:n alfa-kierteistä puolta koodaavan alueen käsittävä koetin tunnisti hyvin suurella ehdottomuudella MC5-28 -kantojen molemmat *pspA*-homologiset sekvenssit muttei Rx1:n *pspA*:n kaltaista sekvenssiä. Tämä havainto osoittaa, että MC25-58-kantojen *pspA*:n kaltainen sekvenssi muistuttaa enemmän Rx1:n *pspA*-sekvenssiä kuin Rx1:n *pspA*:n kaltainen sekvenssi. Mikäli näiden kantojen *pspA*:n kaltainen sekvenssi muistuttaa enemmän *pspA*:ta kuin useimmat *pspA*:n kaltaiset sekvenssit, niin se selittäisi sen, miksi me kykenimme toteamaan näiden kantojen *pspA*:n kaltaisten geenien tuotteet omilla MAb-vasta-aineillamme. Kahden erilaisen PspA:n, joita pneumokokit tuottavat in vivo, löytyminen tekee mahdolliseksi toisen PspA:n käytön koostumuksissa sekä toista geeniä varten tarkoitettujen DNA-alukkeiden tai -koettimien käytön pneumokokkien yksiselitteisemmäksi ilmaisemiseksi, määrittämiseksi tai eristämiseksi.

Eristeet ja bakteerisoluviljelmä

Näissä tutkimuksissa kuvatut ja viljellyt pneumokokkieristeet oli saatu vuosien 1986 ja 1988 välisenä aikana espanjalaisista potilaista (yksi aikuinen, Bellvitge Hospital, Barcelona, ja kolme lasta, San Juan de Dios, Barelona) (Taulukko 2). Näitä penisiliinille vastustuskykyisiä pneumokokkeja, jotka ovat alunperin kuuluneet tutkijan

Dr. Brian Spratt kokoelmaan, sai hakijoiden lisäksi Dr. Alexander Tomasz, Rockefeller Institute. Rx1 on karkea pneumokokki, jota on käytetty aikaisemmissa tutkimuksissa, ja se on ensimmäinen eriste, josta *pspA*:n sekvenssi määritettiin. Bakteereita kasvatettiin Todd-Hewitt -alustalla, joka sisälsi 0,5 % hiivauutetta, tai veriagarmaljoilla yön yli kynttilämaljassa. Kapseliserotyyppi varmistettiin soluagglutinaatiolla, käyttäen tanskalaisia antiseerumeja (Statens Seruminstitut, Kööpenhamina, Tanska) aikaisemmin kuvatulla tavalla. Myöhemmin eristeiden tyypiksi todettiin 6B Quellung-reaktiolla, käyttäen Dr. Barry Gray:n valmistamia kaniinin antiseerumeja 6a- tai 6B-kapseliantigeenia vastaan.

Bakteerihajotteet

Soluhajotteet valmistettiin inkuboimalla kasautettuja bakteerisoluja liuoksessa, joka sisälsi 0,1 % natriumdeoksikolaattia, 0,01 % natriumdodekyylisulfaattia (SDS) ja 0,15 M natriumsitraattia, minkä jälkeen hajote laimennettiin 0,5 M Tris-hydrokloridilla (pH 6,8) aikaisemmin kuvatulla tavalla. Hajotteessa läsnäolevan pneumokokkiproteiinin kokonaismäärä määritettiin bikinkonihappoon perustuvalla menetelmällä (BCA-proteiinimääritysreagenssi; Pierce Chemicl Company, Rockford, IL).

PspA:n serotyypin määritys

PspA:n serotyyppi määritettiin aikaisemmin kuvatuilla menetelmillä. Lyhyesti, pneumokokkien soluhajotteet käsiteltiin SDS-PAGE -menetelmällä, siirrettiin nitroselluloosakalvoille ja kehitettiin Western-täplinä käyttäen seitsemää PspA:ta vastaan vaikuttavaa MAb-vasta-ainetta. PspA:n serotyyppejä kuvataan PspA:n kanssa reagoivista MAb-vasta-aineista muodostuvan erityisen MAb-yhdistelmän avulla.

Pesäkkeen immuunitäplien muodostaminen

Kymmenen ml:n putkelliseen Todd-Hewitt -alustaa, joka sisälsi 0,5 % hiivauutetta, siirrostettiin yön ajan veriagarmaljalla kasvanutta MC23-viljelmää. Eristeen annettiin kasvaa pitoisuuteen 10^7 solua/ml, joka todettiin 0,07 olevana optisena tiheytenä

aallonpituudella 590 nm. MC23-kannasta tehtiin laimennussarja ja laimennusta levitettiin veriagarmaljoille siten, että maljaa kohden saatiin arviolta 100 solua. Levyjen annettiin kasvaa yön yli kynttilämaljassa ja tarkkarajaisia pesäkkeitä käsittävä yksilohkoinen agarmalja valittiin. Sitten neljä nitroselluloosakalvoa laitettiin peräkkäin maljan päälle. Jokaista kalvoa painettiin kevyesti ja jätettiin paikoilleen 5 minuutiksi. Western blot -määrityksellä todetun kahden proteiinin välisen vaihe-eron mahdollisuuden tutkimiseksi levyltä otettiin vain yksi pesäke, se suspendoitiin Ringer:in liuokseen ja levitettiin veriagarmaljalle. Kalvot kehitettiin Western blot -täplien tavoin PspA:n serotyypin määrittämiseen sopivien menetelmien mukaisesti.

Kromosomaalinen DNA-valmiste

Pneumokokkien kromosomaalista DNA:ta eristettiin esimerkissä 9 kuvatulla tavalla. Solut otettiin talteen, ne huuhdottiin, hajotettiin ja pilkottiin 37 °C:ssa 1 tunnin ajan liuoksessa, joka sisälsi 0,5 % (paino/tilavuus) SDS ja 100 μg/ml proteinaasi K:ta. Soluseinämäjäte, proteiinit ja polysakkaridit kompleksoitiin liuoksessa, joka sisälsi 1 % heksadekyylitrimetyyliammoniumbromidia (CTAB) ja 0,7M natriumkloridia, 65 °C:ssa 20 minuuttia ja uutettiin sitten kloroformin ja isoamyylialkoholin seoksella. DNA saostettiin 0,6 tilavuudella isopropanolia, huuhdottiin ja suspendoitiin uudestaan puskuriin, jonka koostumus oli 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0. DNA-pitoisuus määritettiin spektrofotometrisellä analyysillä, aallonpituudella 260 nm.

Koettimen valmistus

5'- ja 3'-oligonukleotidialukkeita, jotka olivat homologiset Rx1 *pspA*:n nukleotidien 1-26 ja 1967-1990 kanssa (vastaavasti LSM13 ja LSM2), käytettiin täysipituisen *pspA*:n monistamiseksi ja koettimen LSM*pspA*13/2 muodostamiseksi Rx1:n perimän DNA:sta. Nukleotidien 161—187 ja nukleotidien 1093—1117 kanssa homologisia 5'- ja 3'-oligonukleotidialukkeita (vastaavasti LSM 12 ja LSM 6) käytettiin vaihtelevan alfa-kierteisen alueen monistamiseksi, jolloin saatiin koetin LSM*pspA*12/6. PCR-tekniikalla tuotettu DNA puhdistettiin Gene Clean-menetelmällä (Bio101 Inc., Vista,

CA) ja leimattiin satunnaisalukkeella digoksigeniini-11-dUTP käyttäen reagenssipakkausta Genius 1 Nonradioactive DNA Labeling and Detecting Kit, valmistajan ohjeiden mukaisesti (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN).

DNA-elektroforeesi

Southern blot -analyysia varten noin 10 μg kromosomaalista DNA:ta pilkottiin täydellisesti vain yhdellä restriktioendonukleaasilla (HindIII, Kpn 1, EcoR1, Dra1 tai Pst1), ja käsiteltiin sitten 16—18 tuntia elektroforeesilla, käyttäen 0,7 % agaroosigeeliä ja 35 voltin jännitettä. PCR-analyysia varten 5 μg tuotetta inkuboitiin yhdessä vain yhden restriktioendonukleaasin kanssa (Bcl1, BamH1, Pst1, Sac1, EcoR1, Sma1 ja Kpn1), ja käsiteltiin sitten 2—3 tunnin ajan elektroforeesilla käyttäen 1,3 % agaroosigeeliä ja 90 voltin jännitettä. Kummassakin tapauksessa käytettiin 1 kb:n DNA-tikkaita molekyylipainon merkkiaineena (BRL, Gaitherburg, MD) ja geelejä värjättiin etidiumbromidilla 10 minuuttia ja ne valokuvattiin yhdessä viivaimen kanssa.

Southern blot -hybridisaatio

Geelillä olevasta DNA:sta poistettiin puriinia 0,25N HCl-liuoksessa 10 minuuttia, se denaturoitiin 0,5M NaOH-liuoksessa ja 1,5M NaCl-liuoksessa 30 minuuttia ja neutraloitiin 30 minuuttia liuoksessa, joka sisälsi 0,5M Tris-HCl (pH 7,2), 1,5M NaCl ja 1 mM dinatrium-EDTA. DNA siirrettiin nailonkalvolle (Micron Separations Inc., MA) käyttäen täplien muodostamiseen POSIBLOT Pressure Blotter -välinettä (Stratagene, La Jolla, CA) 45 minuuttia ja kiinnitettiin UV-säteilyllä. Näitä kalvoja esihybridisoitiin 3 tuntia 42 °C:ssa liuoksessa, jonka koostumus oli 50 % formamidia, 5x SSC, 5x Denhardt:in liuos, 25 mM natriumfosfaatti (pH 6,5), 0,5 % SDS, 3 % (p/til) dekstraanisulfaattia ja 500 μg/ml denaturoitua lohen, sisältäen 45 % formamidia, 5x SSC, 1x Denhardt:in liuosta, 20 mM natriumfosfaattia (pH 6,5), 0,5 % SDS, 3 % (p/til) dekstraanisulfaattia, 250 μg/ml denaturoitua, leikattua lohen sperman DNA:ta ja noin 20 ng lämmön avulla denaturoitua, diogoksigeenilla leimattua DNA-koetinta. Hybridisaation jälkeen kalvot pestiin kahdesti, kulloinkin 3 minuuttia huoneen lämpötilassa liuoksella, jonka koostumus oli 0,1 % SDS ja 2x

SSC. Kalvot huuhdottiin kahdesti lopulliseen ehdottomuuteen liuoksella, joka sisälsi 0,1 % SDS, 0,3x SSC, 65 °C:ssa 15 minuuttia. Tällä tavalla menettelemällä päästään yli 95 % olevaan ehdottomuuteen (stringency). Kalvot kehitettiin käyttäen valmista reagenssipakkausta Genius 1 Nonradioactive DNA Labeling and Detecting Kit, valmistajan ohjeiden mukaisesti (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Jotta kalvoilla voitaisi toteuttaa muita hybridisointeja muiden koettimien kanssa, niitä huuhdottiin 30 minuuttia 40 °C:ssa 0,2 N NaOH/0,1 % SDS -liuoksessa, minkä jälkeen ne huuhdottiin kahdesti 2x SSC-liuoksessa.

Polymeraasiketjureaktio (PCR)

Tässä kokeessa käytettiin 5'- ja 3'-alukkeita, jotka olivat homologiset PspA:n N- ja C-päätteen päitä koodaavan DNA:n kanssa (vastaavasti LSM13 ja LSM2). Monistaminen toteutettiin käyttäen Taq DNA-polymeraasia, yhdistettä $MgCl_2$ ja 10x reaktiopuskuria, jota oli saatu yhtiöstä Promega (Madison, WI). PCR-reaktiossa käytetty DNA valmistettiin aikaisemmin tässä julkaisussa kuvatulla menetelmällä. Reaktiot toteutettiin 50 ml:n tilavuudessa, joka sisälsi 0,2 mM kutakin dNTP:tä sekä 1 ml kumpaakin aluketta 50 mM olevana käyttöpitoisuutena. Yhdistettä $MgCl_2$ käytettiin 1,75 mM olevana optimaalisena pitoisuutena yhdessä Taq DNA-polymeraasin 0,25 yksikön kanssa. Jokaiseen reaktioputkeen lisättiin 10—30 ng perimän DNA:ta. Monistusreaktiot suoritettiin Thermal Cycler-laitteessa (M.J. Research, Inc.) käyttäen seuraavaa kolmivaiheista ohjelmaa. Vaiheessa 1 käytettiin 94 °C olevaa denaturoivaa lämpötilaa 2 minuutin ajan. Vaihe 2 koostui 9 täydellisestä syklistä, jossa syklissä käytettiin 94 °C olevaa denaturoivaa lämpötilaa 1 minuutin ajan, 50 °C olevaa kiinnityslämpötilaa 2 minuutin ajan ja 72 °C olevaa jatkamislämpötilaa 3 minuutin ajan. Vaihe 3 toistettiin 19 kertaa, käyttäen 94 °C olevaa denaturoivaa lämpötilaa 1 minuutin ajan, 60 °C olevaa kiinnityslämpötilaa 2 minuutin ajan ja 72 °C olevaa jatkamislämpötilaa 3 minuutin ajan. Viimeisen syklin päätyttyä näytteitä pidettiin 72 °C:ssa 5 minuuttia jatkamisen viemiseksi täydellisesti päätökseen.

Vyöhykkeen koon arvioiminen

Kappaleiden koot molekyylipainostandardien kuviossa ja Southern blot -hybridisaatiokuviossa laskettiin siirtymisetäisyyksistä. Standardimolekyylikoot sovitettiin logaritmiseen regressiomalliin käyttäen Cricket Graph -käyrää (Cricket Software, Malvern, PA). Ilmaistujen vyöhykkeiden molekyylipainot arvioitiin sijoittamalla Cricket Graph-käyrän avulla saatu logaritminen viivayhtälö Microsoft:in Excel-ohjelmaan (Microsoft Corporation, Redmond, WA) molekyylipainojen laskemiseksi Southern blot -määrityksessä saatujen siirtymisetäisyyksien perusteella.

Taulukko 15

Restriktio-entsyymi	Tutkitut kannat					Restriktiokappaleet (koot kiloemäksinä)	
	MC25	MC26	MC27	MC28	RX1	MC25-MC28	RX1
HINIII	+	+	+	+	+	7,7, 3,6	9,1, 4,2
Kpn I	+	+	+	+	+	11,6, 10,6	10,6, 9,8
EcoR I	+				+	8,4, 7,6	7,8, 6,6
Dra I	+				+	2,1, 1,1	1,9, 0,9
Pst I	+				+	>14, 6,1	10,0, 4,0

13.05.98 980561

Taulukko 16 Penisilliinille vastustuskykyiset, kapseliserotyyppiä 6 olevat espanjalaiset kannat

Eriste	Penisilliini	MIC	(μg/ml)	Vuosi	Paikka	Sairaala
MC25		1		1986	yskös	Bellvitge
MC26		4		1988	korva	San Juan de Dios
MC27		1		1988	korva	San Juan de Dios
MC28		2		1988	?	San Juan de Dios

Esimerkki 5 - *pspA*-sekvenssien ja *pspA*-kappaleiden Southern blot -analyysi

Tässä esimerkissä hakijat käyttivät *S. pneumoniae* Rx1:n *pspA*:n DNA-sekvenssistä saatuja oligonukleotideja sekä hybridisaatiokoettimina että alukkeina polymeraasiketjureaktiossa eri *pspA*-alueiden ja *pspA*:n kaltaisten sekvenssien alueiden geneettisen vaihtelun ja säilyneisyyden selvittämiseksi. Käytettyjen koettimien koko vaihteli 17 ja 33 emäksen välillä, ja niihin kuuluivat sekvenssit, jotka edustivat -35:ttä, johtosekvenssiä, alfa-kierteistä aluetta, runsaasti proliinia sisältävää aluetta, toistoalueita ja C-päätettä. Hakijat tarkastelivat 18 erilaista eristettä, jotka edustivat 12 kapselityyppiä ja 9 PspA-serotyyppiä. Runsaasti proliinia sisältävä alue, toistoalue ja johtosekvenssi olivat hyvin säilyneitä *pspA*:n ja *pspA*:n kaltaisen sekvenssin välillä.

Aikaisemmassa esimerkissä osoitettiin, että Rx1-kannassa ja useimmissa muissa *S. pneumoniae* -kannoissa oli kaksi homologista sekvenssiä, jotka kykenivät hybridisoitumaan PspA:n N-päätteen ja C-päätteen puolia koodaavien koettimien kanssa. Sitä johtopäätöstä, että kysymyksessä olivat erilliset sekvenssit, tuki se tosiseikka, että käytetyistä restriktioentsyymeistä riippumatta saatiin aina vähintään kaksi (yleensä kaksi, joskus kolme tai neljä) Rx1:n restriktiokappaletta ja useimmat muut kannat hybridisoituivat näihin *pspA*-koettimiin. Kun Rx1:n perimä pilkottiin entsyymillä HindIII ja hybridisoitiin näiden kanssa, niin tällöin kahden *pspA*-homologisen sekvenssin todettiin olevan läsnä 4,0 ja 9,1 kb:n kappaleissa. Rx1-johdannaista, joka käsitti istutusmutaatioita *pspA*:ssa, käyttämällä voitiin määrittää, että 4,0 kb:n kappale sisälsi toiminnallisen *pspA*-sekvenssin. 9,1 kb:n vyöhykkeen sisältämään *pspA*-homologiseen sekvenssiin viitattiin käsitteellä *pspA*:n kaltainen sekvenssi. Sitä, tuottaako tämä *pspA*:n kaltainen sekvenssi jokin tuotteen, ei tunneta eikä minkäänlaista tuotetta ole tunnistettu in vitro. Koska *pspA*-spesifisten mutanttien tuottaminen voi olla vaikeata useimmissa kannoissa ja koska niitä on olemassa vain rajallisessa lukumäärässä pneumokokkieristeitä, niin tämä esimerkki tunnistaa oligonukleotidikoettimet, jotka voivat erottaa *pspA*-sekvenssin ja *pspA*:n kaltaisen sekvenssin toisistaan.

Tämän esimerkin tavoitteena oli edelleen määritellä sekä *pspA*:n säilynyt alue että sen vaihteleva alue, sekä määrittää, onko keskellä sijaitseva, runsaasti proliinia sisältävä alue vaihteleva vai säilynyt, sekä tunnistaa ne *pspA*-domeenit, jotka ovat kaikkein säilyneimpiä *pspA*:n kaltaisessa sekvenssissä (ja tämän perusteella saada aikaan oligonukleotidit, jotka kykenevät erottamaan nämä kaksi toisistaan). Oligonukleotidit ovat käyttökelpoisia ja tästä syystä niitä voidaan käyttää sekä hybridisaatiokoettimina että alukkeina polymeraasiketjureaktioon (PCR) perustuvassa analyysissa.

Hybridisaatio oligonukleotidikoettimilla

Tässä tutkimuksessa käytetyt oligonukleotidit perustuivat aikaisemmin määritettyyn Rx1 PspA-sekvenssiin. Kuviossa 7 on esitetty niiden asema ja suuntautuminen Rx1 PspA:n rakenteellisten domeenien suhteen. Näiden oligonukleotidikoettimien reaktiivisuus *pspA*-sekvenssin ja *pspA*:n kaltaisen sekvenssin kanssa selvitettiin hybridisoimalla Rx1:n perimän DNA:n HindIII-pikkeeseen (taulukko 17). Odotetusti kukin kahdeksan koetinta tunnisti *pspA*:n sisältävän 4,0 kb:n kappaleen tästä HindIII:lla pilkotusta Rx1 DNA:sta. Viisi näistä kahdeksasta koettimesta (LSM1, 2, 3, 7 ja 12) kykeni myös tunnistamaan *pspA*:n kaltaisen sekvenssin 9,1 kb:n vyöhykkeestä ainakin heikolla ehdottomuudella. Hyvin ehdottomissa olosuhteissa neljä näistä koettimista (LSM2, 3, 4 ja 5) oli spesifisiä 4,0 kb:n suhteen.

Näiden 8 koettimen avulla seulottiin 18 *S. pneumoniae* -kannasta saadun DNA:n HindIII-pilke sekä pienellä että suurella ehdottomuudella. Jotta vertaaminen aikaisempiin tutkimuksiin olisi mahdollista, jokainen näistä kannoista seulottiin myös käyttäen täysipituista *pspA*-koetinta. Taulukossa 23 on esitetty tulokset, jotka on saatu kullakin kannalla suurella ehdottomuudella. Taulukkoon 18 on koottu koettimien reaktiivisuudet kantojen kanssa suurella ja pienellä ehdottomuudella. Kanta Rx1 on kliinisen eristeen D39 laboratoriojohdannainen. Näillä kummallakin kannalla saadut tulokset olivat samanlaiset. Ne on lueteltu saman otsikon alla taulukossa 23 ja ne on katsottu yhdeksi kannaksi taulukossa 28. Vaikka AC17 ja AC94 ovatkin samankaltaisia kliinisiä eristeitä, niissä on kuitenkin erilainen *pspA*, ja ne on mainittu toisistaan erillisinä. Kaikki muut kannat edustavat itsenäisiä eristeitä.

Ainoa kanta, josta ei saatu vähintään kahta *pspA*-homologista HindIII-kappaletta, oli WU2. Tämä havainto oli odotettavissa, koska aikaisemmin on osoitettu, että WU2 käsittää vain yhden *pspA*-homologisen sekvenssin ja että siitä saadaan vain yksi ainoa HindIII-kappale, joka hybridisoituu Rx1 *pspA*:n kanssa. Myös suurella ehdottomuudella kuusi kahdeksasta koettimesta ilmaisi useampia kuin yhden kappaleen vähintään yhdessä taulukoissa 18 ja 23 esitetyissä 18 kannassa. Koettimet LSM7, 10 ja 12 reagoivat suurimmasta osasta kantoja saadun DNA:n kanssa ja ilmaisivat kaksi kappaletta yli 59 %:ssa niistä kannoista, joiden kanssa ne reagoivat. Lähes jokaisessa tapauksessa näiden oligonukleotidikoettimien ilmaisemat kappaleet olivat kooltaan samanlaisia täysipituisen *pspA*-koettimen ilmaisemien kappaleiden kanssa. Lisäksi koettimet ilmaisivat usein samat kappaleparit sekä Rx1 *pspA*:n 3'-puolesta että sen 5'-puolesta. Nämä tulokset ovat yhtäpitäviä niiden aikaisempien havaintojen kanssa, että yksittäisistä eristeistä peräisin olevat HindIII-kappaleiden parit käsittävät yleensä kaksi erillistä mutta homologista sekvenssiä eikä vain yhden *pspA*-geenin kappaleita.

Taajuudessa, jolla oligonukleotidit reagoivat vähintään yhden kantajoukon kannoista saadun kappaleen kanssa, todetut erot olivat merkittäviä arvolla $P < 0{,}0001$ (2×8 chi^2). Kun näitä oligonukleotideja verrattiin toisiinsa ajatellen niiden kykyä reagoida kunkin kannan molempien kappaleiden kanssa, niin tälöin P-arvo oli samoin $< 0{,}0001$. Taulukossa 18 on esitetty prosentteina niiden kantojen osuus, jotka kannat reagoivat jokaisen koettimen kanssa, niiden kantojen osuus, joissa kannoissa vain yksi kappale oli reaktiivinen, sekä niiden kantojen osuus, joissa kannoissa kaksi kappaletta (tai useampia) oli reaktiivisia.

Taulukon 18 viimeisessa sarakkeessa on esitetty suhde, joka saatiin jakamalla niiden kantojen, joissa todettiin yksi reaktiivinen HindIII-kappale suurella ehdottomuudella, lukumäärä reaktiivisten kantojen kokonaislukumäärällä. Tässä sarakkeessa 1 olevat arvot saatiin koettimilla, jotka reagoivat vain yhden vyöhykkeen kanssa kussakin reaktiivisessa kannassa. Nämä koettimet oletetaan sellaisiksi, jotka ovat kaikkein spesifisimpiä *pspA*:n suhteen. Pienimmät arvot saatiin koettimilla, jotka yleensä tunnistavat kaksi vyöhykettä kussakin kannassa. Nämä koettimet oletetaan sellaisiksi, jotka edustavat *pspA*- ja *pspA*:n kaltaisten sekvenssien välillä suhteellisen säilyneitä

alueita. Suurella ehdottomuudella koettimet LSM3 ja LSM4 ilmaisivat vain yhden HindIII-kappaleen niiden kantojen, joiden kanssa ne reagoivat, DNA:ssa. Näiden havaintojen perusteella voidaan päätellä, että koettimet LSM3 ja LSM4 ilmaisivat yleensä *pspA*:n alleeleja eikä *pspA*:n kaltaisen sekvenssin alleeleja. Se havainto, että kaikki muutkin reaktiiviset koettimet ilmaisivat myös LSM3- tai LSM4-koettimen ilmaisemat kappaleet, vahvisti sitä johtopäätöstä, että nämä koettimet ilmaisivat yleensä *pspA*-sekvenssin eivätkä *pspA*:n kaltaisen sekvenssin. WU2:ssa on vain yksi *pspA*-homologinen DNA-sekvenssi ja se erittää serologisesti ilmaistavaa PspA:ta. Se tosiseikka, että LSM3 reagoi vain yhden WU2 HindIII-kappaleen kanssa, on yhtäpitävää sen tulkinnan kanssa, että LSM3 ilmaisee *pspA*-sekvenssejä. Toista proliinialuetta ja C-päätettä edustavat sekvenssit (vastaavasti LSM1 ja LSM2) osoittautuivat myös suhteellisen spesifisiksi *pspA*-sekvenssien suhteen, koska ne kyettiin ilmaisemaan vain kunkin kannan yhdestä HindIII-kappaleesta.

Oligonukleotidit LSM12 ja LSM10 ilmaisivat kaikkein säilyneimmät *pspA*-epitoopit ja ne reagoivat yleensä kunkin kannan kummankin *pspA*-homologisen kappaleen kanssa (taulukko 18). LSM7 ei ollut aivan niin laajasti ristireaktiivinen, mutta se ilmaisi kaksi PspA:ta 41 %:sta kantoja, mukaan lukien lähes 60 % niistä kannoista, joiden kanssa se reagoi. Näin ollen johtosekvenssiä, ensimmäistä proliinialuetta sekä toistoaluetta edustavat sekvenssit eivät näytä olevan suhteellisen säilyneitä vain *pspA*-sekvenssissä vaan myös *pspA*- ja *pspA*:n kaltaisten sekvenssien välillä. LSM3, -4 ja -5 reagoivat kaikista oligonukleotideista pienimmästä kantafraktiosta peräisin olevan DNA:n kanssa (29—35 %), minkä perusteella voidaan päätellä, että alfa-kierteistä aluetta koodaava *pspA*:n osa on vähiten säilynyt *pspA*-alue.

Kahden kannan eli kantojen BG85C ja L81905 tapauksessa oligonukleotidit ilmaisivat useampia kuin kaksi, *pspA*-homologisia sekvenssejä sisältävää HindIII-kappaletta. Koska nämä oligonukleotidikoettimet ovat pienikokoisia ja koska niistä kaikista puuttuu HindIII-restriktiokohta, niin erittäin epätodennäköistä on se, että nämä lukuisat fraktiot olisi saatu tuloksena siinä alueessa, jossa koettimia oli käytetty, toteutetusta kohde-DNA:n fragmentoinnista. Lähes jokaisessa tapauksessa useampi kuin yksi oligonukleotidi ilmaisi ylimääräiset oligonukleotidit suurella ehdottomuu-

della. Nämä tulokset viittaavat voimakkaasti siihen, että vähintään näissä kahdessa kannassa on 3 tai 4 sellaista sekvenssiä, jotka ovat homologisia vähintään *pspA*:n osien kanssa. Näiden ylimääräisten sekvenssien kanssa kaikkein reaktiivisimmat koettimet ovat johtosekvenssin, alfa-kierteisen alueen ja runsaasti proliinia sisältävän alueen koettimet. Näiden ylimääräisten *pspA*:n kaltaisten sekvenssien olemassaoloon viittaavat edelleen ne pienellä ehdottomuudella kannoilla BG58C ja L81905 saadut tulokset, että LSM3 (alfa-kierteinen) -aluke poimi L81905:n ylimääräisen 1,2 kb:n vyöhykkeen (3,6 kb:n vyöhykkeen lisäksi) ja LSM7 (runsaasti proliinia sisältävä) -aluke poimi BG58C:n ylimääräiset 3,2 ja 1,4 kb:n vyöhykkeet (3,6 kb:n vyöhykkeen lisäksi).

<u>*pspA*:n monistaminen</u>

Näiden oligonukleotidien käyttökelpoisuus PCR-alukkeina selvitettiin määrittämällä, kykenivätkö ne monistamaan *pspA*:n kappaleita eri pneumokokkieristeiden perimän DNA:sta. Hakijat yrittivät monistaa *pspA*:ta 14 eri *S. pneumoniae* -kannasta, jotka edustivat 12 erilaista kapselityyppiä, käyttäen Rx1 *pspA*-sekvenssiin perustuvia alukkeita. Hakijat havaitsivat, että *pspA*:n 3'-päähän sijoittuva 3'-aluke LSM2 monistaa ilmeisen *pspA*-sekvenssin jokaisesta 14 pneumokokkikannasta, kun sitä käytetään yhdessä runsaasti proliinia sisältävää aluetta koodaavaan *pspA*-alueeseen sijoittuvan LSM1:n kanssa. LSM2:ta käytettiin myös yhdessä neljän muun 5'-alukkeen kanssa eli alukkeiden LSM1, -3, -7, -8 ja -12 kanssa. LSM8 sijoittuu 5' *pspA*:n alkamiskohdan suhteen (lähelle -35-aluetta).

Mikäli saatiin monistetuksi pituudeltaan odotetunlainen hallitseva sekvenssi, joka voitiin ilmaista Southern blot -määrityksessä täysipituisella *pspA*-koettimella, oletimme, että monistuneen DNA:n *pspA*-geenissä oli käytettyjen *pspA*-alukkeiden sekvenssien kaltaisia homologisia sekvenssejä. Näiden kriteereiden perusteella alfa-kierteistä sekvenssiä edustava aluke todettiin heikommin säilyneeksi kuin ne alukkeet, jotka edustivat johtosekvenssiä, proliinisekvenssiä ja C-päätteen sekvenssiä. Nämä tulokset olivat yhtäpitäviä hybridisaatiosta tehtyjen havaintojen kanssa. Pienin monistumistaajuus todettiin LSM8-alukkeella, joka on peräisin *pspA*:n alkamiskohdan suhteen 5'

sijaitsevasta Rx1-sekvenssistä. Tätä oligonukeotidiä ei käytetty hybridisointitutkimuksissa.

Lisänäyttöä vaihtelusta saadaan siitä, että monistuneet *pspA*-geenit ovat eri kokoisia. Tämä esimerkki osoitti, että kun PCR-alukkeita LSM12 ja LSM2 käytettiin PspA:n koko koodaavan alueen monistamiseen, niin eri pneumokokkieristeistä saatujen tuotteiden koko vaihteli alueella 1,9—2,3 kb (taulukko 20). Alfa-kierteistä sekvenssiä, runsaasti proliinia sisältävää sekvenssiä ja toistosekvenssiä koodaavia, *pspA*:han sisältyviä alueita monistettiin myös samoista eristeistä. Kuten taulukosta 20 nähdään, *pspA*:n koon vaihtelu näytti johtuvan suureksi osaksi alfa-kierteistä aluetta koodaavan *pspA*:n koon vaihtelusta.

Suurin piirtein *pspA*:n 5'- ja 3'-puolista koostuvia koettimia käyttäen ollaan määritetty, että alfa-kierteisiä alueita koodaava *pspA*:n osa on säilynyt huonommin kuin *pspA*:n se osa, johon on koodautunut molekyylin C-päätteen osa. Tämä esimerkki osoittaa käyttäen PspA:ta koodaavan DNA:n kummastakin puolesta peräisin olevaa neljää oligonukleotidikoetinta. Koska hakijat käyttivät nyt enemmän pienempiä koettimia, he ovat saaneet selvemmän kuvan *pspA*:ssa säilyneistä ja vaihtelevista sekvensseistä ja he ovat myös kyenneet tunnistamaan uskotavalla tavalla erilaisia ja samanlaisia alueita *pspA*:n ja *pspA*:n kaltaisen sekvenssin välillä.

Ainoat kannat, joissa *pspA*-geeni on tunnistettu molekyylimutaatioilla, ovat Rx1, D39 ja WU2. Rx1- ja D39-kannoissa on ilmeisesti samanlainen *pspA*-molekyyli, joka on seurausta siitä, että nämä kaksi kantaa on muodostettu laboratoriossa yhdestä ja samasta kannasta. WU2:sta puuttuu *pspA*:n kaltainen geeni. Täten, kun useimmat pneumokokit tutkitaan Southern blotting -menetelmällä, jossa käytetään koettimena täysipituista *pspA*:ta, niin tällöin *pspA* ja *pspA*:n kaltainen geenialue eivät erotu toisistaan, koska kumpikin niistä voidaan ilmaista helposti. Näiden tutkimusten pääasiallisena tavoitteena oli yrittää tunnistaa säilyneet ja muuttuneet alueet *pspA*- ja *pspA*:n kaltaisesta geenialueesta. Tavoitteena oli samoin määrittää, onko mahdollista tunnistaa Rx1 *pspA*:han perustuvat koettimet, joiden avulla *pspA* kyetään erottamaan *pspA*:n kaltaisesta sekvenssistä. Ihanteellisessa tapauksessa tällaiset koettimet

perustuisivat *pspA*-sekvenssin suhteellisen säilyneeseen osaan, joka oli sangen erilainen *pspA*:n kaltaisessa sekvenssissä. Käyttökelppoisen, *pspA*-spesifisen koettimen voidaan odottaa tunnistavan tunnetut Rx1 ja WU2 *pspA*-geenit sekä tunnistavan vain yhden ainoan HindIII-kappaleen useimmista muista kannoista. Kaksi koetinta (LSM3 ja LSM4) eivät reagoineet koskaan useamman kuin yhden *pspA*-homologisen sekvenssin kanssa missään erityisessä kannassa. Kumpikin niistä reagoi Rx1 *pspA*:n kanssa ja LSM3 reagoi WU2 *pspA*:n kanssa. Kumpikin näistä koettimista reagoi muista 15 kannasta 4 kanssa. Kuitenkin, kun nämä koettimet tunnistivat vyöhykkeen, niin yleensä myös kaikki muutkin, tämän kannan DNA:n kanssa reaktiiviset Rx1-koettimet ilmaisivat tämän vyöhykkeen. Muu osoitus siitä, että koettimien LSM3 ja LSM4 reaktiivisuus rajoittui *pspA*:han, oli se, että ne reagoivat samojen vyöhykkeiden kanssa kaikissa kolmessa, Rx1-kannasta poikkeavassa kannassa. Jokainen koetin tunnistaa *pspA*:n tietyissä kannoissa, ja jopa yhdessä käytettyinä ne tunnistivat *pspA*:n yli 40 %:ssa kannoista. *PspA*:n toisen, runsaasti proliinia sisältävän alueen koetin (LSM1) ja *pspA*:n C-päätteen koetin (LSM2) tunnistivat yleensä vain yhden *pspA*-homologisen sekvenssin suurella ehdottomuudella. LSM1, -2, -3 ja -4 reagoivat yhdessä 17 eristeestä 16 kanssa ja ne paljastivat kussakin tapauksessa yleispätevän vyöhykkeen, jonka lähes kaikki tai kaikki reaktiiviset koettimet tunnistivat.

Olettamalla, että eri kannoissa Rx1 *pspA*-koettimet tunnistavat todennäköisemmin *pspA*-sekvenssit kuin *pspA*:n kaltaiset sekvenssit, on mahdollista ennakoida jollakin tavalla säilyneet alueet ja vaihtelevat alueet *pspA*- ja *pspA*:n kaltaisissa sekvensseissä. Kun koetin ilmaisi vain yhden *pspA*-homologisen sekvenssin eristeestä, niin tällöin sen oletettiin olevan *pspA*. Mikäli koetin ilmaisi kaksi *pspA*-homologista sekvenssiä, niin tällöin sen oletettiin reagoivan sekä *pspA*- että *pspA*:n kaltaisen sekvenssin kanssa. Näin ollen se likimääräinen taajuus, jolla koetin ilmaisee *pspA*:n, voidaan todeta taulukosta 18 samoin kuin niiden kantojen, joissa koetin ilmaisee vähintään yhden *pspA*-homologisen vyöhykkeen, prosentuaalinen osuus. Se likimääräinen taajuus, jolla koettimet ilmaisevat *pspA*:n kaltaisen sekvenssin, on niiden kantojen, joista kaksi tai useampia *pspA*-homologisia vyöhykkeitä saadaan ilmaistuksi, prosentuaalinen osuus.

Näitä oletuksia käyttäen kaikkein vaihtelevimmaksi osaksi *pspA*-geenissä todettiin -35-alue ja alfa-kierteistä aluetta koodaava osa. *PspA*:n kaikkein säilyneimmäksi osaksi todettiin toistoalue, johtoalue sekä runsaasti proliinia sisältävä alue. Vaikka tästä alueesta käytettiinkin vain yhtä koetinta, niin Rx1-sekvenssissä 10 toiston suuren säilymisasteen johdosta on todennäköistä, että toistoalueiden muillakin koettimilla saadaan samankaltaisia tuloksia.

pspA:n kaltaisen sekvenssin se osa, joka muistutti kaikkein eniten Rx1 *pspA*:ta, oli se osa, johon oli koodautunut johtosekvenssi, runsaasti proliinia sisältävän alueen 5'-osa sekä toistoalue, sekä ne osat, joihin oli koodautunut runsaasti proliinia sisältävän alueen ja toistoalueen N-päätteen päät. PspA:n toistoalueen on näytetty osallistuvan PspA:n kiinnittymiseen pneumokokin pintaan. Toistoalueen säilyminen sekä *pspA*-geenin että *pspA*:n kaltaisen geenin välillä viittaa siihen, että mikäli pspA:n kaltaista proteiinia syntyy, niin siinä voi olla samankaltainen mekanismi pintaan kiinnittymistä varten kuin PspA:ssa. Toiminnallisen kiinnittymiskohdan tarve voi selittää toistoalueen säilymisen. Edelleen, *pspA*-geenin ja *pspA*:n kaltaisen geenin toistoalueita koodaavan DNA:n säilyminen viittaa siihen, että toistoalueet voivat toimia pneumokokkeja torjuvan lääkeaineen mahdollisena kohteena. Johtosekvenssin säilyminen *pspA*-sekvenssin ja *pspA*:n kaltaisen sekvenssin välillä ei ollut yllättävää, koska samanlaista säilymistä on kuvattu myös muiden gram-positiivisten proteiinien kuten A-ryhmään kuuluvien streptokokkien M-proteiinin johtosekvenssille. Huomattavaa on kuitenkin, ettei DNA-tasolla ole juurikaan näyttöä siitä, että PspA-johtaja olisi yhteinen monille muille geeneille kuin PspA:lle sekä *pspA*:n kaltaisen geenialueen mahdolliselle geenituotteelle.

Vaikka *pspA*:n C-päätettä koodaava alue (LSM12) tai runsaasti proliinia sisältävän sekvenssin 3'-osaa koodaava alue (LSM1) näyttääkin olevan hyvin säilynyt *pspA*-geeneissä, niin kuitenkin vastaavat alueet *pspA*:n kaltaisissa sekvensseissä joko puuttuvat tai eroavat huomattavasti *pspA*:n vastaavista alueista. Syy näiden kohtien säilymiseen ei ole ilmeinen. PspA:n tapauksessa sen C-pääte ei näytä olevan välttämätön kiinnittymistä ajatellen, sillä mutantit, joista C-päätteen 49 aminohappoa puuttuvat, näyttävät kiinnittyvän solun pintaan yhtä tiukasti kuin täydellisen sekvens-

sin käsittävät proteiinit. Tuntematonta on se, viittaako tämä ero *pspA*:sta hienoon eroon näiden kahden sekvenssin tuottamien proteiinien kiinnittymismekanismissa. Mikäli *pspA*:n kaltaisessa sekvenssissä C-päätteen pää tai *pspA*:n kaltaisessa sekvenssissä runsaasti proliinia sisältävän sekvenssin 3'-osa ovat yhtä säilyneitä *pspA*:n kaltaisten geenien perheessä kuin mitä ne ovat *pspA*:n joukossa, niin tällöin *pspA*:n ja *pspA*:n kaltaisen sekvenssin tämä alue toimii kohteena sellaisten koettimien kehittämiseksi, joiden koettimien avulla kaikki *pspA*-geenit ja *pspA*:n kaltaiset geenit voidaan erottaa toisistaan.

Kahden kannan tapauksessa eräät oligonukleotidikoettimet tunnistivat useampia kuin kaksi *pspA*-homologista sekvenssiä. Näissä molemmissa kannoissa esiintyi hallitseva sekvenssi, jonka lähes kaikki koettimet tunnistivat, sekä kaksi tai kolme muuta sekvenssiä, joista jokaisen vähintään kaksi näistä koettimesta tunnisti. Tulosten eräs tulkinta on se, että joissakin kannoissa voi esiintyä useampia kuin kaksi *pspA*-homologista geeniä. Tällaisten sekvenssien merkitystä ei olla kyetty läheskään selvittämään. Mielenkiintoista on kuitenkin se, että vaikka näillä lisäsekvensseillä on yhteisiä homologisuusalueita johtoalueen, alfa-kierteisen alueen ja proliinialueen kanssa, niin niillä ei ollut lainkaan homologiaa *pspA*:n C-päätteen toistoalueen kanssa. Nämä sekvenssit voisivat täten toimia elementteinä, jotka voivat yhdistyä uudestaan *pspA*:n ja/tai *pspA*:n kaltaisten sekvenssien kanssa vaihtelun tuottamiseksi sekvensseihin. Vaihtoehtoisesti nämä sekvenssit saattavat tuottaa molekyylejä, joissa on hyvin erilaiset C-päätteen alueet, ja jotka eivät ehkä ole kiinnittyneet pintaan. Kuitenkin, mikäli nämä *pspA*:n kaltaiset sekvenssit tuottavat tuotteita, niin ne saattavat olla PspA:n tavoin arvokkaita komponentteja pneumokokkeja torjuvissa antigeenisissa, immunologisissa tai rokotekoostumuksissa.

<u>Bakteerikannat, kasvatusolosuhteet ja kromosomaalisen DNA:n eristäminen</u>

Tässä tutkimuksessa käytetyt *S. pneumoniae* -kannat on lueteltu taulukossa 5. Kantoja kasvatettiin 100 ml:ssa Todd-Hewitt -elatusalustaa, joka sisälsi 0,5 % hiivauutetta, 37 °C:ssa siten, että solutiheydeksi saatiin arviolta $5x10^8$ solua/ml. Solut otettiin talteen sentrifugoimalla (2900 xg, 10 minuuttia), DNA eristettiin aikai-

semmin kuvatulla tavalla ja sitä säilytettiin 4 °C:ssa TE-puskurissa (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0).

PspA-sekvenssien monistaminen

Polymeraasiketjureaktion (PCR) alukkeet, joita käytettiin myös oligonukleotidikoettimina Southern-hybridisoinneissa, toteutettiin Rx1-pneumokokkikannasta peräisin olevan *pspA*-sekvenssin perusteella. Nämä oligonukleotidit saatiin yhtiöstä Oligos Etc. (Wilsonville, OR) ja ne on lueteltu taulukossa 22.

PCR-reaktiot toteutettiin yhtiön MJ Research, Inc., ohjelmoitavalla, erilaisissa lämpötiloissa käsittelevällä laitteella Programmable Thermal Cycler (Watertown, MA) aikaisemmin kuvatulla tavalla, käyttäen noin 10 ng pneumokokkien perimän DNA:ta yhdessä sopivan 5'- ja 3'-alukeparin kanssa. Näytteen kokonaistilavuus asetettiin arvoon 50 μl ja se sisälsi lopullisena pitoisuutena 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 M $MgCl_2$, 0,001 % gelatiinia, 0,5 mM kutakin aluketta, 200 mM kutakin deoksinukleotiditrifosfaattia ja 2,5 U Taq DNA-polymeraasia. Näytteiden päälle kaadettiin 50 μl mineraaliöljyä, minkä jälkeen näytteitä denaturoitiin 94 °C:ssa 2 minuuttia. Sitten näytteitä käsiteltiin 10 jakson ajan, jokaisen jakson käsittäessä 1 minuutti 94 °C:ssa, 2 minuuttia 50 °C:ssa ja 3 minuuttia 72 °C:ssa, mitä seurasi 20 jaksoa, joista jokainen käsitti 1 minuutti 94 °C:ssa, 2 minuuttia 50 °C:ssa ja 3 minuuttia 72 °C:ssa, minkä jälkeen toteutettiin vielä 20 jaksoa, joista jokainen käsitti 1 minuutti 94 °C:ssa, 2 minuuttia 60 °C:ssa ja 3 minuuttia 72 °C:ssa. Kaikkien 30 jakson jälkeen näytteitä pidettiin 72 °C:ssa vielä 5 minuuttia ennen jäähdyttämistä 4 °C:n lämpötilaan. PCR-tuotteet analysoitiin elektroforeettisesti agaroosigeelillä.

DNA-hybridisaatioanalyysi

Noin 5 μg kromosomaalista DNA:ta pilkottiin entsyymillä HindIII valmistajan ohjeiden mukaisesti (Promega, Inc., Madison, WI). Pilkottua DNA:ta käsiteltiin elektroforeettisesti 35 mV:n jännitteellä yön yli 0,8 % agaroosigeeleillä ja sitten

muodostettiin tyhjön avulla täplät Nytran-kalvoille (Schleicher & Schuell, Keene, NH).

Sekä oligonukleotidin leimaaminen koettimen ja kohteen välisillä hybrideillä että näiden koettimen ja kohteen välisten hybridien ilmaiseminen toteutettiin Genius System-järjestelmällä valmistajan ohjeiden mukaisesti (Mannheim, Indianapolis, IN). Kaikki hybridisoinnit toteutettiin 18 tunnin ajan 42 °C:ssa ilman formamidia. Käsitteet "suuri" ja "pieni" ehdottomuus (stringency) määritettiin hybridisaation jälkeisten pesujen suolapitoisuuden ja lämpötilan perusteella olettaen, että 1-prosenttinen emäsparien yhteensopimattomuus aiheuttaa Tm-arvon pienenemisen 1 °C:n verran. Koetin- ja kohdesekvenssien välinen homologia saatiin käyttäen laskettua Tm-arvoa vakiintuneella menetelmällä. Suuri ehdottomuus on määritelty 90-prosenttiseksi tai suuremmaksi homologiaksi ja pieni ehdottomuus on 80—85 -prosenttinen sekvenssien homologia.

Taulukko 17. Oligonukleotidien hybridisaatio Rx1 DNA:sta saaduilla HindIII-restriktiokappaleilla

Oligonukleotidi	Alue	Ehdottomuus	
		pieni	suuri
LSM12	johtaja	e.m.	4,0, 9,1
LSM5	α-kierre	e.m.	4,0
LSM3	α-kierre	4,0, 9,1	4,0
LSM4	α-kierre	4,0	4,0
LSM 7	proliini	4,0, 9,1	4,0, 9,1
LSM1	proliini	4,0, 9,1	4,0, 9,1
LSM10	toistot	e.m.	4,0, 9,1
LSM2	C-pääte	4,0, 9,1	4,0

Huom. Esitetyt arvot ovat restriktiokappaleiden kokoja yksikössä kb.

Taulukko 18 Yhteenveto 8 oligonukleotidin ja kuviossa 2 luetelluista 17 pneumokokkieristeestä saatujen HindIII-restriktiokappaleiden välisestä hybridisaatiosta suurella ja pienellä ehdottomuudella

Oligonukleotidi	prosenttia		prosenttia		prosenttia		prosenttia	
	≥1:n vyöhykkeen kanssa		≥2:n vyöhykkeen kanssa		≥1:n vyöhykkeen kanssa		1 vyöhyke/ ≥1 vyöhyke	
	pieni	suuri	pieni	suuri	pieni	suuri	pieni	suuri
LSM 12		82		59		24		0,29
LSM5		29		18		12		0,40
LSM3	65	35	41	0	24	35	0,36	1,00
LSM4	35	29	0	0	35	29	1,00	1,00
LSM7	94	71	71	41	24	29	0,25	0,42
LSM1	100	65	53	12	47	53	0,47	0,82
LSM10		94		59		35		0,37
LSM2	88	53	41	12	47	41	0,53	0,78

Huom. kaikkien lueteltujen arvojen tapauksessa kaikki 17 kantaa tutkittiin. Mikäli yhtään arvoa ei ole mainittu, niin tällöin yhtään kantaa ei tutkittu.

Taulukko 19 Pneumokokkieristeiden monistaminen käyttäen mainittua 5'-aluketta yhdessä 3'-alukkeen LSM2 kanssa *pspA*:n 3'-päässä

5'-aluke	Alue	Nukelotidin asema	Monistuneet/ testattu	Monistu-neet, %
LSM8	- 35	47—70	2/14	14
LSM12	johtaja	162—188	8/14	57
LSM3	α-kierre	576—598	3/14	21
LSM7	proliini	1093—1117	12/14	86
LSM1	proliini	1312—1331	14/14	100

Huom. 2x5 chi^2 -analyysin perusteella eri alukkeet monistivat pspA:ta erilaisilla taajuuksilla ($P < 0,0001$). Taipumus siihen, että monistuminen oli parempaa enemmän 3'-pään puolella sijaitsevilla alukkeilla, oli merkittävä arvolla $P < 0,0001$.

Taulukko 20. Monistuneiden *pspA*-kappaleiden koko kiloemäksinä (kb)

pspA-alue	Alukeparit	Tutkittujen *pspA*-sekvenssien lkm	Koko	Alue	Stand. poikk.
täysipit.	LSM12+LSM2	9	1,9-2,3	0,4	0,17
α-kierre	LSM12+LSM6	6	1,1-1,5	0,4	0,17
proliini	LSM7+LSM9	3	0,23	0	0
toistot	LSM1+LSM2	19	0,6-0,65	0,05	0,01

Huom. Monistaminen toteutettiin kullakin alukeparilla 19 erilaisesta pspA-sekvenssistä muodostuvassa joukossa. Tulokset on esitetty vain niille *pspA*-sekvensseille, jotka voitiin monistaa mainitulla alukeparilla.

Taulukko 21 Pneumokokkikannat

Kanta	Asiaan liittyvät tunnusomaiset piirteet
WU2	Kapselityyppi 3, PspA-tyyppi 1
D39	Kapselityyppi 2, PspA-tyyppi 25
R36A	D39:n kapseloitumaton mutantti, PspA-tyyppi 25
Rx1	R36A:n kapseloitumaton mutantti, PspA-tyyppi 25
DBL5	Kapselityyppi 5, PspA-tyyppi 33
DBL6A	Kapselityyppi 6A, PspA-tyyppi 19
A66	Kapselityyppi 3, PspA-tyyppi 13
AC94	Kapselityyppi 9L, PspA-tyyppi 0
AC17	Kapselityyppi 9L, PspA-tyyppi 0
AC40	Kapselityyppi 9L, PspA-tyyppi 0
AC107	Kapselityyppi 9V, PspA-tyyppi 0
AC100	Kapselityyppi 9V, PspA-tyyppi 0
AC140	Kapselityyppi 9N, PspA-tyyppi 18
D109-1B	Kapselityyppi 23, PspA-tyyppi 12
BG9709	Kapselityyppi 9, PspA-tyyppi 0
BG58C	Kapselityyppi 6A, PspA-tyyppi ND
L81905	Kapselityyppi 4, PspA-tyyppi 25
L81905	Kapselityyppi 4, PspA-tyyppi 25
L82233	Kapselityyppi 14, PspA-tyyppi 0
L82006	Kapselityyppi 1, PspA-tyyppi 0

Taulukko 22 PCR-alukkeet

Aluke	Sekvenssi (5' --> 3')
LSM1	CCGGATCCAGCTCCTGCACCAAAAC
LSM2	GCGCGTCGACGGGCTTAAACCCATTATTCACCATTGG
LSM3	CCGGATCCTGAGCCAGAGCAGTTGGCTG
LSM4	CCGGATCCGCTCAAAGAGATTGATGAGTCTG
LSM5	GCGGATCCCGTAGCCAGTAGCCAGTCAGTCTAAAGCTG
LSM6	CTGAGTCGACTGGAGTTTCTGGAGCTGGAGC
LSM7	CCGGATCCAGCTCCAGCTCCAGAAACTCCAG
LSM8	GCGGATCCTTGACCAATATTTACGGAGGAGGC
LSM9	GTTTTTGGTGCAGGAGCTGG
LSM10	GCTATGGCTACAGGTTG
LSM11	CCACCTGTAGCCATAGC
LSM12	CCGGATCCAGCGTGCCTATCTTAGGGGCTGGTT
LSM13	GCAAGCTTATGATATAGAAATTTGTAAC

Taulukko 23	Kahdeksan erilaisen PspA-koettimen hybridisoituminen suurella ehdottomuudella 18 *Streptococcus pneumoniae*-kannasta saatuun HindIII-pilkkeeseen																
Koetin	Kanta																
	Rx1/ D39	WU2	DBL5	DBL6A	A66	AC94	AC17	AC40	AC107	AC100	AC140	DC109	BG9709	BG58C	LB1905	LB2233	LB2006
FL-Rx1	4,0, 9,1	3,8	3,7, 5,8	3,0, 3,4	3,6, 4,3	3,6, 6,3	3,6, 6,3	3,2, 3,6	3,6, 6,3	4,0, 8,0	3,0, 4,0	3,3, 4,7	2,2, 9,6	1,4, 3,2, 3,6	3,6, 5,2	3,7, 6,2	4,2, 6,4
LSM12	4,0, 9,1	3,8	3,7, 5,8	3,0, 3,4	4,3		3,6, 6,3	3,2, 3,6		4,0, 8,0	4,0	3,3, 4,7	2,2, 9,6	1,3, 3,2, 3,6	3,6	1,3, 3,7	
LSM5	4,0					3,6, 6,3							2,2, 9,6	3,6	1,2, 2,3, 3,6		
LSM3	4,0	3,8				6,3							2,2	3,6	3,6		
LSM4	4,0												2,2	3,6	3,6	3,7	
LSM7	4,0, 9,1	3,8	3,7	3,0, 3,4	3,6			3,2, 3,6			4,0	3,3, 4,7	2,2, 9,6	3,6	2,3, 3,6	3,7	
LSM1	4,0, 9,1	3,8	3,7, 5,8	3,4		6,3		3,2	3,6	4,0	4,0		2,2		5,2		
LSM10	4,0, 9,1	3,8	3,7	3,4	3,6, 4,3		3,6, 6,3	3,2	3,6, 6,3	4,0	3,0, 4,0	3,3, 4,7	2,2, 9,6	3,2, 3,6	3,6, 5,2	1,3, 3,7	4,3, 6,4
LSM2	4,0		3,7			3,6	3,6		3,6, 6,3	4,0		4,7					4,3

Huom. Kaikki koettimet testattiin kaikkien kantojen HindIII-pilkkeillä. Mikäli yhtään vyöhykettä ei ole mainittu, niin tällöin niitä ei todettu lainkaan. Kannat Rx1 ja D39 tuottivat samanlaiset tulokset ja ne on esitetty vain yhdessä sarakkeessa. Kannan AC109 täydellinen nimi on AC109-1B.

Esimerkki 6 - *pspA*:n restriktiokappaleiden pituuden monimuotoisuus osoittaa ryhmien muodostumisen

Pneumokokin A-pintaproteiini (PspA) on suojan tuottava *Streptococcus pneumoniae* -eliön proteiini. PspA-proteiinille päätellyn aminohapposekvenssin perusteella voidaan olettaa kolme erilaista domeenia; alfa-kierteinen käämimäinen alue, jota seuraa kaksi vierekkäistä, runsaasti proliinia sisältävää aluetta ja 10 toistuvaa aluetta, jotka koostuvat 20 aminohaposta. Lähes kaikki PspA-molekyylit ovat eriasteisesti ristireaktiivisia toistensa kanssa. Kuitenkin, käyttämällä yksittäisille epitoopeille spesifisten monoklonaalisten vasta-aineiden joukkoa, tässä proteiinissa on todettu huomattavaa vaihtelua jopa samaa kapselityyppiä olevien kantojen välillä. *S. pneumoniae* Rx1-kannasta peräisin olevan *pspA*:n sekvenssiin perustuvia oligonukleotidialukkeita käytettiin täysipituisen *pspA*-geenin ja tähän geeniin kuuluvan, alfa-kierteisen alueen ja runsaasti proliinia sisältävän alueen sisältävän 5'-osan monistamiseksi. PCR-monistettu tuote pilkottiin entsyymillä HhaI tai Sau3A I *pspA*:n restriktiokappaleiden pituuden monimuotoisuuden havainnollistamiseksi. Vaikka kannat olikin saatu ympäri maailmaa ja ne edustivat 21 erilaista kapselityyppiä, niin eristeet voitiin kuitenkin ryhmitellä 17 ryhmäksi tai alaryhmäksi niiden RFLP-kuvion perusteella. Tämän lähestymistavan hyväksyttävyys varmistettiin osoittamalla, että yksittäisten kantojen *pspA*:t, jotka tiedetään klonaalisesti toistensa kaltaisiksi, löytyivät aina vain yhden *pspA*-perheen sisältä.

Pneumokokkien epidemiologisessa kartoituksessa on käytetty lukuisia tekniikoita, joista voidaan mainita serotyypin määritys, ribotyypin määritys, pulssitettuun kenttään perustuva elektroforeesi, monipaikkainen entsymaattinen elektroforeesi, penisilliiniin sitoutuvilla proteiineilla saadut kuviot ja DNA-sormenjälkien määritys. Aikaisemmissa tutkimuksissa on myös käytetty hyväksi pneumokokin A-pintaproteiinissa (PspA) esiintyvää vaihtelua pneumokokkien erottamiseksi. Tämä proteiini, joka voi saada aikaan pneumokokkeja torjuvia, suojaavia vasta-aineita, on kaikissa pneumokokkieristeissä todettu virulenssitekijä. Vaikka PspA-molekyylit ovat yleensä ristireaktiivisia, ne ovat harvoin antigeenisesti samanlaisia. Tämä pintaproteiini on serologisesti kaikkein vaihtelevin tunnettu proteiini pneumokokkien pinnalla; näin

ollen se on erinomainen merkki, jota voidaan käyttää yksittäisten kantojen seuraamiseksi. PspA:n ja sen rakenteellista geeniä ympäröivän DNA:n vaihtelevuus on osoittautunut käyttökelpoiseksi *S. pneumoniae* -kantojen erottamiseksi.

Kun polyklonaalisia seerumeita käytetään PspA:n tunnistamiseksi, niin ristireaktioita odotetaan olennaisesti kaikkien eristeiden välillä. Kääntäen, kun erilaisia monoklonaalisia vasta-aineita käytetään itsenäisen eristeen PspA:n vertaamiseksi, niin niiden todetaan lähes aina ilmentävän PspA-epitooppien erilaisia yhdistelmiä. Tähän lähestymistapaan perustuvaan tyypinmääritysjärjestelmään liittyy rajoituksia, koska se ei selitä helposti monoklonaalisten vasta-aineiden ja eri PspA-molekyylien välisen sitoutumisen lujuudessa esiintyviä eroja. Lisäksi eräät kannat ovat heikosti reaktiivisia yksittäisten monoklonaalisten vasta-aineiden kanssa eikä niillä saada aina yhtäpitäviä tuloksia.

Näin ollen oli välttämätöntä kehittää yksiselitteisempi tyypinmääritysjärjestelmä, jossa käytettiin hyväksi PspA:ssa esiintyvää vaihtelua, ja jota käytettiin kantojen klonaalisuuden selvittämiseksi. Tässä menetelmässä selvitetään *pspA*-geenialueen DNA ja sen vieressä sijaitseva DNA. Erilaisilla endonukleaaseilla kuten HindIII, DraI tai Kpn I pilkotun, pneumokokista peräisin olevan kromosomaalisen DNA:n, jossa käytetään koettimena leimattua *pspA*:ta, Southern-hybridisaatio on eräs keino tutkia *pspA*:ta ympäröivässä kromosomissa esiityvää vaihtelua. Kun perimän DNA:han liitetään koetin, niin *pspA*- ja *pspA*:n kaltainen geenialue paljastuvat. Useimmissa pilkkeissä *pspA*-koetin hybridisoituu 2-3 kappaleeseen ja itsenäisten eristeiden pilkkeet eivät yleensä olleet samanlaisia.

Samoin kuin monoklonaalisen tyypinmääritysjärjestelmänkin tapauksessa, Southern:in hybridisaatiomenettelyn avulla voitiin ilmaista pneumokokkien klooneja. Sitä ei voida kuitenkaan käyttää molekyylitason lähestymistapana *pspA*:ssa esiintyvän vaihtelun seuraamiseksi. Monet niistä restriktiokohdista, jotka määrittävän restriktiokappaleen pituuden monimuotoisuuden (RFLP), olivat *pspA*-geenin ulkopuolella ja *pspA*-geenin erottaminen *pspA*:n kaltaisesta alueesta oli vaikeata. Pyrittäessä kehittämään järjestelmää *pspA*:ssa esiintyvän vaihtelun seuramiseksi hakijat tarkastelivat PCR-monistetun

pspA:n RFLP-kuviota. Monistettu *pspA* pikottiin restriktioentsyymeillä Sau3A I ja Hha I, joilla on neljä emästä käsittävät tunnistuskohdat. Tämän lähestymistavan käyttökelpoisuuden arvioimiseksi kliinisistä ja laboratoriokannoista, jotka tiedetään klonaalisesti toistensa kaltaisiksi, sekä satunnaiseristeistä peräisin olevaa *pspA*:ta tutkittiin.

Bakteerikannat

S. pneumoniae D39-Rx1 -perheen johdannaisia saatiin Rob Massure:n ja Sanford Lacks:in ystävällisenä lahjoituksena (Kuvio 8). Kahdeksan kliinistä eristettä Espanjasta ja neljä eristettä Unkarista, lahjana Alexander Tomasz:ilta. Samoin tutkittiin Alabamasta, Ruotsista, Alaskasta ja Kanadasta saatua 75 kliinistä satunnaiseristettä.

PCR-monistaminen

Tässä tutkimuksessa käytetyt oligonukleotidialukkeet on lueteltu taulukossa 24. PCR-reaktioissa käytettiin mallineena kromosomaalista DNA:ta, joka oli eristetty Dillard:-in et al. kuvaamilla menetelmillä. Monistaminen toteutettiin 50 μl:n reaktiossa, joka sisälsi noin 50 ng malline-DNA:ta, 0,25 U Taq, 50 μM kutakin aluketta, 175 μM $MgCl_2$ ja 200 μM dNTP:tä reaktiopuskurissa, joka sisälsi 10 μM Tris-HCl, pH 9,0, 50 μM KCl, 0,1 % Triton X-100, 0,01 % paino/tilavuus gelatiinia. Seoksen päälle kaadettiin mineraaliöljyä, ja se laitettiin DNA:ta erilaisissa lämpötiloissa käsittelevään laitteeseen. Monistusohjelma käsitti ensimmäisen denaturointivaiheen 94 °C:ssa, mitä seurasi 29 jaksoa 94 °C:ssa 1 minuutin ajan, 55 °C 2 minuuttia ja 72 °C:ssa 3 minuuttia. Viimeinen jakso käsitti inkuboinnin 72 °C:ssa 5 minuutin ajan.

PCR-monistetusta tuotteesta saatujen restriktiokappaleiden analyysi

PCR-seoksista otetut näytteet pilkottiin entsyymillä Hha I tai Sau3A I 20 μl olevassa lopullisessa tilavuudessa, valmistajan ohjeiden mukaan. Pilkkomisen jälkeen DNA-kappaleet käsiteltiin elektroforeettisesti 1,3 % TBE-agaroosigeelillä ja värjättiin

etidiumbromidilla. Kappaleiden koko arvioitiin vertaamalla 1 kb:n DNA-tikkaisiin (Gibco BRL).

Koska *pspA*:ssa esiintyy vaihtelua ja koska koko *pspA*-sekvenssi tunnetaan vain yhden geenin suhteen, niin mahdollista ei ole ollut suunnitella alukkeita, jotka monistavat *pspA*:ta 100 %:sta pneumokokkikantoja. Oligonukleotidialukkeet LSM2 ja LSM1 kykenevät monistamaan C-päätteen päästä 800 emäsparin alueen 72 kannassa 72 testatun kannan joukosta. Perustuen eri ehdottomuuksilla toteutettuihin hybridisaatioihin, tämä alue todettiin suhteellisen säilyneeksi pneumokokkikannoissa, ja näin ollen sen ei voida odottaa olevan optimaalinen ajatellen restriktiokappaleiden monimuotoisuuden seuraamista *pspA*-molekyylissä. LSM13 ja LSM2 eli alukkeet, jotka monistavat täysipituista *pspA*-geeniä, voivat monistaa *pspA*:ta noin 79 %:ssa 55/75 testatuista kannoista (taulukko 25).

Monistetun RFLP-kuvion pysyvyys klonaalisesti samankaltaisissa pneumokokeissa

Jotta saataisiin määritetyksi *pspA*:n pysyvyys in vitro-toteutetuissa pitkissä solunsiirtokokeissa, hakijat tutkivat *S. pneumoniae* D39-Rx1 -perheen johdannaisista peräisin olevan *pspA*-geenin RFLP-kuviota. Rx1 on *S. pneumoniae* D39-kannan kapseliton johdannainen, D39:n ollessa vuonna 1914 Avery:n eristämä pneumokokkien laboratoriokantojen prototyyppi. Koko 1900-luvun ajan eri laboratoriot ovat aiheuttaneet D39-kantaan spontaaneja ja kemiallisia mutaatioita (Kuvio 8). Tämän ajanjakson aikana kapseloitumattomia kantoja ylläpidettiin in virto, ja D39-kantaa siirrettiin sekä in vivo että in vitro. Kaikki D39-johdannaiset, mukaan lukien Rx1, R6, RNC ja R36A, tuottivat 1,9 kb:n kappaleen, kun täysipituinen *pspA* PCR-monistettiin. Tämän perheen kaikilla jäsenillä saatiin RFLP-kuvio. PCR-monistetun täysipituisen *pspA*:n pikkominen entsyymillä Sau3A I tuotti 0,83, 0,58, 0,36 ja 0,27 kb:n kappaleet tämän perheen kaikissa D39 Rx1-johdannaisissa. Täysipituisen *pspA*:n pilkkominen entsyymillä Hha I tuotti vyöhykkeet, joiden koko oli 0,76, 0,47, 0,39, 0,35 ja 0,12 kb (kuvio 9 tai taulukko 26).

pspA:n monimuotoisuuden pysyvyyttä tutkittiin myös käyttämällä pneumokokkieristeitä, jotka oli aikaisemmin osoitettu klonaalisesti toistensa kaltaisiksi muiden kriteereiden kuten kapselityypin, antibiootin vastustuskyvyn, entsyymielektromorfin ja PspA-serotyypin perusteella. Kolme eristejoukkoa, jotka kaikki olivat hyvin vastustuskykyisiä penisilliinin suhteen, oli saatu potilaista toisaalta Unkarissa esiintyneen epidemian aikana ja toisaalta kahden, Espanjassa esiintyneen erillisen epidemian aikana. Kapselityyppiä 19A olevien, unkarilaisesta epidemiasta saatujen pneumokokkikantojen DB18, DB19, DB20 ja DB21 PCR-monistettu täysipituinen *pspA* johti noin 2,0 kb:n kokoiseen vyöhykkeeseen. Sen jälkeen, kun täysipituinen *pspA* oli pilkottu Hha I:llä, näkyviin saatiin neljä kappaletta, joiden koot olivat 0,89, 0,48 ja 0,28 kb. Pikkominen entsyymillä Sau3A I tuotti viisi kappaletta, joiden koot olivat 0,880, 0,75, 0,35, 0,34 ja 0,10 kb. Kapselityyppiä 6B olevat pneumokokkikannat DB1, DB2, DB3 ja DB4 saatiin Espanjassa esiintyneestä epidemiasta. Näistä kannoista saadun täysipituisen *pspA*:n koko oli noin 1,9 kb. PCR-monistetun kappaleen pilkkominen entsyymillä Hhs I tuotti neljä kappaletta, joiden koot olivat 0,83, 0,43, 0,33 ja 0,28 kb. Pikkominen entsyymillä Sau3A I tuotti kappaleet, joiden koot olivat 0,88, 0,75, 0,34 ja 0,10 kb. DB6, DB8 ja DB9, jotka ovat kapseliserotyyppiä 23F olevia kantoja, eristettiin toisesta espanjalaisesta epidemiasta. DB6-, DB8- ja DB9-kantojen monistuneen *pspA*-tuotteen koko oli 2,0 kb. Hha I-pilkottujen kappaleiden koko oli 0,90, 0,52, 0,34 ja 0,30 kb ja Sau3A I-kappaleet olivat kooltaan 0,75, 0,52, 0,39, 0,22, 0,20 ja 0,10 kb (kuvio 10). DB7:n kapseliserotyyppi oli 19A ja se ei ollut samanlainen kuin DB6, DB8 ja DB9. D39/Rx1-perheessä ja kussakin kolmessa, epidemioista saaduissa perheissä niiden kappaleiden, jotka oli saatu pilkkomalla entsyymillä Hha I tai Sau3A I, koko oli yhteensä noin 2,0 kb, joka vastaa odotuksia, mikäli monistunut tuote edustaa vain yhtä *pspA*-sekvenssiä.

<u>Pneumokokkien satunnaiseristeistä saadun monistetun *pspA*:n RFLP-kuviossa esiintyvä vaihtelu</u>

70 satunnaisesta kliinisestä pneumokokkieristeestä peräisin olevan *pspA*-geenin PRC-monistaminen tuotti täysipituisen *pspA*:n, jonka koko vaihteli alueella 1,8—2,3 kb.

PCR-reaktiosta saadun *pspA*:n RFLP-analyysi tuotti 2—6 DNA-kappaletta, joiden koko vaihteli 100 emäsparista 1,9 kiloemäspariin kannasta riippuen. Näiden kappaleiden laskettu summa ei ylittänyt koskaan alkuperäisen monistetun kappaleen kokoa. Kaikissa pneumokokkikannoissa ei ollut kuitenkaan vain yhtä *pspA*-sekvenssiä ja eräistä, eri maantieteellisiltä alueilta saaduista ja eri kapselityyppiä olevista eristeistä, jotka eivät näennäisesti olleet toistensa kaltaisia, saatiin samankaltaiset RFLP-kuviot. Eristeet ryhmiteltiin perheiksi entsyymeillä Hha I ja Sau3A I pilkkomalla syntyneiden kappaleiden lukumäärän ja näiden kappaleiden suhteellisen koon perusteella.

RFLP-kuvioiden perusteella oli mahdollista tunnistaa 17 perhettä, joista 4 perhettä sisälsi aliperhepareja. Perheiden sisällä kaikki restriktiokappaleet olivat olennaisesti samoja riippumatta siitä, mitä restriktioentsyymiä oli käytetty. Aliperheet edustavat tilanteita, joissa suurin osa, ei kuitenkaan kaikki restriktiokappaleet ovat yhteisiä kahdelle perheelle. Tiettyjen kantojen tapauksessa todettiin RFLP-kuvio, jossa kappaleen ilmaistava koko poikkesi vakiintuneen perheen kuviosta vähemmän kuin 100 emäsparin verran. Koska näitä eroja pidettiin pieninä verrattuna kappaleen koon ja kappaleiden lukumäärien välisiin eroihin perheiden välillä, niin niitä ei otettu huomioon perhettä määrättäessä. Kuudesta tällaisesta perheestä saadun kahden eristeen RFLP-kuvio on esitetty kuviossa 11, taulukko 27. Nämä perheet olivat täysin riippumattomia kapselityypistä tai proteiinityypistä, kuten monoklonaalisilla vastaaineilla voitiin todeta (taulukot 28 ja 29).

Aikaisemmat, DNA-hybridisaatioon perutuneet tutkimukset ovat osoittaneet, että eri eristeiden *pspA*-geeneissä säilyminen on suurinta geenin 3'-alueessa ja vaihtelua esiintyy geenin 5'-alueessa. Näin ollen todennäköiseltä näyttää se, että *pspA*-perheiden väliset erot johtuvat pääasiassa geenin 5'-pään erilaisuudesta. Tämän teorian varmistamiseksi *pspA*:n alfa-kierteistä ja proliinialuetta tutkittiin ilman aminohappotoistoja. Nukleotidialukkeita LSM13 ja KSH2 käytettiin tämän kappaleen, jonka koko oli noin 1,6 kb, monistamiseksi. Tämän *pspA*-alueen tutkiminen tuotti kaksi tulosta.

Tämän alukeparin avulla voitiin monistaa 90 % kannoista, mikä on enemmän kuin se 75 % kannoista, jotka kyettiin monistamaan täysipituisen geenin monistavilla

oligonukleotideilla. Toiseksi, sen avulla hakijat kykenivät selvittämään sen, oliko täysipituiseen geeniin perustuva alkuperäinen ryhmittely yhtäpitävä geenin 5'-puolikkaasta saatujen sormenjälkikuvioiden kanssa.

Kuvio 12 sisältää ne samat kannat, joita tutkittiin kuviossa 11, mutta PCR-tuotteet monistettiin muodosteilla SKH2 ja LSM13. RFLP-kuviot, jotka oli saatu pilkkomalla monistettu alfa-kierteinen ja runsaasti proliinia sisältävä alue, vahvistavat alunperin määritetyt perheet. Nämä alukkeet monistavat kuitenkin pienemmän osan *pspA*:sta ja tästä syystä perheiden väliset erot eivät ole niin dramaattisia kuin niissä RFLP-kuvioissa, jotka on saatu täysipituisen geenin RFLP-kuviosta.

Polymeraasiketjureaktio on yksinkertaistanut menetelmää *pspA*-geenin analysoimiseksi ja sen avulla *pspA*:ssa esiintyvää vaihtelua voidaan käyttää hyväksi *S. pneumoniae* -eliön epidemiologian tutkimiseksi. Koska kaikki kannat eivät sisältäneet ainutlaatuista *pspA*-sormenjälkeä, niin *pspA*:n RFLP-kuvioita ei voida käyttää yksinään kannan klonaalisuuden tunnistamiseksi. Nämä tulokset osoittavat, että pneumokokkikannoista saadun, PCR-monistetun *papA*:n RFLP-kuvio voi olla yhdessä muiden tekniikoiden kanssa käyttökelpoinen klonaalisen samankaltaisuuden tunnistamiseksi pneumokokkieristeiden keskuudessa, ja että tämä kuvio on pysyvä pitkän in vitro-ylläpidon ajan.

Nämä havainnot viittaavat siihen, ettei *pspA*-populaatio ole niin vaihteleva kuin mitä alun perin on uskottu. *pspA*:n PCR-RFLP voi mahdollisesti olla suhteellisesti liikaa yksinkertaistava tekniikka geenissä esiintyvän vaihtelun nopeaksi toteamiseksi jossakin populaatiossa. Edelleen, nämä havainnot tekevät mahdolliseksi tekniikat *S. pneumoniae* -eliön diagnostoimiseksi PRC-tekniikalla tai hybridisoimalla alukkeita tai koettimia tietylle ryhmälle yhteisiin *pspA*-alueisiin.

Sekvenssitutkimukset jakavat tunnetut kannat useiksi perheiksi sekvenssien homologian perusteella. Sekvenssitiedot osoittavat, että *pspA*-geenien keskuudessa on tapahtunut voimakasta luonnollista uudelleenyhdistymistä. Tämän uudelleenyhdistymisen summavaikutus on se, että tiettyjen sekvenssien perusteella tunnistettujen

perheiden erilaisuus riippuu siitä, mitä *pspA*-molekylin osaa on käytetty analyysissa. Alfa-kierteisen alueen 5'-puolen, alfa-kierteisen alueen 3'-puolen ja runsaasti proliinia sisältävän alueen perusteella tunnistetut "perheet" ja "ryhmät" ovat kulloinkin erillisiä ja ne eroavat hieman toisistaan. Lisäksi selvää näyttöä on muuten läheisesti toistensa kaltaisten molekyylien muunlaisista eroista (kuten sekvensseissä esiintyvät emäskorvautumiset ja -häviämät ja -lisäykset).

Tämä tulos osoittaa, että odotettavissa on osittain päällekkäisten PspA-sekvenssien jatkuva joukko, eikä erillisten sekvenssien joukko.

Nämä havainnot osoittavat, että sekvenssin säilyminen on voimakkainta alfa-kierteisen alueen 3'-puolikkaassa ja välittömästi 5' sijaitsevassa kärjessä. Koska vaihtelu alfa-kierteisen alueen keskellä sijaitsevassa osassa on suurempaa, niin tämä alue ei ole kovinkaan käyttökelpoinen ajatellen rokotekomponenttien ja altistavien kantojen välisen ristireaktiivisuuden ennustamiseksi. Niinpä alfa-kierteisen alueen 3'-puolen sekvenssi ja koodaavan sekvenssin 5'-kärki ovat todennäköisesti kriittiset PapA:n ja rokotekoostumuksen välisten ristireaktioiden ennustamiseksi.

Runsaasti proliinia sisältävän alueen sekvenssi ei ole ehkä erityisen tärkeä rokotteen koostumukselle, koska tämän alueen ei ole osoitettu tuottavan ristisuojaa, vaikka se on erittäin säilynyt. Syy tähän on luultavasti se, että vasta-aineet tässä alueessa olevia epitooppeja vastaan eivät ole esillä pinnalla.

Tämänhetkisten, 27 erilaisen *pspA*-sekvenssimme perusteella olemme todenneet, että olemassa on neljä alfa-kierteisen alueen 3'-puolikkaan perhettä ja 2-3 alfa-kierteisen alueen välittömän 5'-kärjen perhettä. Ne muodostavat yhdessä kuusi 3'- ja 5'-perheiden yhdistelmää. Näin ollen tämän lähestymistavan avulla meidän tulisi kyetä tunnistamaan joukko sellaisia, 3'- ja 5'-kierteisen sekvenssin käsittäviä *pspA*-sekvenssejä, jotka edustavat yhdessä suurinta lukumäärää erilaisia *pspA*-sekvenssejä. Katso kuvio 13.

Taulukko 29. Kapselityypin ja RFLP-perheen välinen riippuvuus

KAPSELITYYPIN JA RFLP-PERHEEN VÄLINEN RIIPPUVUUS																											
	Kapselityyppi																										
pspA-perhe	1	2	3	4	5	6	6A	6B	7	8	9A	9L	9N	9V	10	11	12	13	14	15	19	22	23	31	33	35	ND
A			3																								
B			1	1																							
C						2	1	2														2					1
D			1				1																				
DD				2																							
E			1	2		1																					
F						1											1						3				1
FF			1			1									1	1											
G																1					1						
H			1			1			2	1							1		1	1	1						
I											2		2	4													
II					1																						
J	2					2						1	1						2		2						1
K		1																					1		1		
KK	1					1		1											1			1					
L																							1				1
M								1																			
MM																				1				1			

Taulukko 24

Tässä tutkimuksessa käytetyt oligonukleotidit

Nimitys	Sekvenssit 5'—3'	Nukleotidiasema
LSM2	GCG CGT CGA CGG CTT AAA CCC ATT CAC CAT TGG	1990—1967
LSM1	CCG GAT CCA GCT CCT GCA CCA AAA AC	1312—1331
LSM13	GCA AGC TTA TGA TAT AgA ATT TTG TAA C	1—26
SKH2	CCA CAT ACC GTT GTT TTC TTG TTT CCA CCA GCC	1333—1355

Taulukko 25 *pspA*:n monistaminen 72 itsenäisen *S. pneumoniae*-eristeen* joukosta

Kapseli-tyyppi	Tutkittujen kantojen lkm	LSM13 ja LSM2	LSM13 ja SKH2
		% monistetuista kannoista	% monistetuista kannoista
1	3	100	100
2	1	100	100
3	8	50	87
4	6	67	100
5	1	100	100
6	7	29	86
6A	2	100	100
6B	6	100	100
7	2	50	100
8	1	100	100
9V	3	100	100
9A	2	100	100
9L	1	100	100
9N	3	100	100
10	1	100	100
11	2	50	100
12	2	0	100
13	1	100	100
14	4	0	75
15	2	50	50
19	5	100	100
22	3	33	100
23	1	100	100
33	1	0	100
35	1	0	100
nd	3	100	100

* Kantakokoelmamme sisältää useita, jo entuudestaan klonaalisiksi tiedettyjen eristeiden ryhmiä, jotka eristeet on kerätty tästä syystä. Tässä taulukossa esitettyihin tietoihin on sisällytetty vain tällaisten klonaalisten ryhmien edustaja.

Taulukko 26 Rx1 D39-johdannaiset

Eriste	Hha I-pilkkeen koko	Sau3A I-pilkkeen koko (kb)
D39	0,76, 0,47, 0,39, 0,35, 0,12	0,83, 0,58, 0,36, 0,27
Rx1	0,76, 0,47, 0,39, 0,35, 0,12	0,83, 0,58, 0,36, 0,27
R800	0,76, 0,47, 0,39, 0,35, 0,12	0,83, 0,58, 0,36, 0,27
R6	0,76, 0,47, 0,39, 0,35, 0,12	0,83, 0,58, 0,36, 0,27
R61	0,76, 0,47, 0,39, 0,35, 0,12	0,83, 0,58, 0,36, 0,27
R6X	0,76, 0,47, 0,39, 0,35, 0,12	0,83, 0,58, 0,36, 0,27
R36NC	0,76, 0,47, 0,39, 0,35, 0,12	0,83, 0,58, 0,36, 0,27
R36A	0,76, 0,47, 0,39, 0,35, 0,12	0,83, 0,58, 0,36, 0,27

Taulukko 27 Itsenäisten eristeiden kantaan liittyviä tietoja ja perheen nimitys

Kanta	Kapseli-tyyppi	PspA-tyyppi	Perhe	*Hha* I kappaleiden koko	*Sau*3A I kappaleiden koko
BG9163	6B	21	C	1,55, 0,35	1,05, 0,35, 0,22
EF6796	6A	1	C	1,5, 0,35	1,05, 0,35, 0,22
EF5668	4	12	DD	1.25. 0,49, 0,32	1,0, 0,80, 0,35
EF8616A	4	ND	DD	1,25, 0,49, 0,32	1,0, 0,80, 0,35
EF3296	4	20	E	1,0, 0,40, 0,33	1,15, 0,50, 0,34
EF4135	4	ND	E	1,0, 0,40, 0,33	1,15, 0,50, 0,34
BG7619	10	ND	F	1,3, 0,40, 0,29, 0,10	0,82, 0,76, 0,35
BG7941	11	ND	F	1,3, 0,40, 0,29, 0,10	0,82, 0,76, 0,35
BG7813	14	8	H	1,05, 0,70, 0,3	0,90, 0,77, 0,35
BG7736	8	ND	H	1,05, 0,70, 0,36	0,90, 0,77, 0,35
AC113	9A	ND	I	1,4, 0,34, 0,28	1,2, 0,80
AC99	9V	5	I	1,4, 0,34, 0,28	1,2, 0,80

Taulukko 28. RFLP-perheen ja PspA-tyypin välinen riippuvuus

KAPSELITYYPIN JA RFLP-PERHEEN VÄLINEN RIIPPUVUUS																					
	PspA-tyyppi																				
pspA-perhe	0	1	3	5	8	12	13	16	18	19	20	21	24	25	26	30	33	34	36	37	ND
A		1					1														
B														1	1						1
C		2										1	1								4
D								1		1											
DD						2															
E		1	1								1					1					
F						1											1				4
FF														1							3
G								1											1		
H	1				1			1		1										1	5
I	3			1				2	2												1
II	4																			1	
J	1								1	1								1			1
K	1	1								1				1							3
KK	1																				
L								1													3
M								1	1												1
MM																					1

Esimerkki 7 - PspA-immunogeenien kyky suojata yksittäisiä altistavia kantoja vastaan

CBA/N- tai BALB cJ-hiirille annettiin 1 injektiona 0,5 μg PspA:ta CFA:ssa, ja sitten kaksi viikkoa myöhemmin tehoste suolaliuoksessa, ja ne altistettiin 7. ja 14. vuorokauden välillä (keskimäärin 10. vuorokautena) tehosteen antamisen jälkeen. Vertailuhiiret immunoitiin samalla tavalla, paitsi että immunointi toteutettiin isogeenisellä kannalla, joka ei kyennyt tuottamaan PspA:ta. PspA oli joko täysipituinen ja se oli eristetty pneumokokista tai se oli kloonattu täysipituinen tai BC100 PspA, sillä vain vähäistä tilastollista merkitystä on todettu täysipituisen PspA:n ja BC100:n immunogeenisyyden välillä. Pneumokokkien altistava annos vaihteli noin alueella 10^3—10^4 pneumokokkia siirrosteessa, mutta kaikissa tapauksissa altistava annos oli vähintään 100 x LD_{50}.

Tulokset on esitetty seuraavissa taulukoissa 30-60, samoin kuin tehdyt johtopäätökset.

Näistä tuloksista todetaan, että antigeeninen, immunologinen tai rokotekoostumus voi sisältää kahdesta seitsemään, edullisesti kolmesta viiteen PspA:ta, esimerkiksi kantojen R36A ja BG9739 PspA:ta yksinään tai yhdessä minkä tahansa, kannasta WU2, EF5668 ja DB15 peräisin olevan PspA:n tai niiden kaikkien kanssa. Huomaa, että yllättäen WU2 PspA:lla saatiin aikaan parempi suoja D39-kantaa vastaan kuin seoksella R36A/Rx1/D39, ja että yllättäen kannasta WU2 saatu PspA suojasi paremmin kantaa BG9739 vastaan kuin kannan BG9739 PspA. Kantojen R36A, BG9739 ja WU2 PspA:ta sisältävät yhdistelmät olivat kaikkein yleisimmin suojaavia; ja näin ollen edullinen koostumus voi sisältää mitä tahansa näistä kolmesta PspA:sta, edullisesti R36A, BG9739 ja WU2 PspA:ta. Tämän esimerkin tulokset osoittavat, että eri kannoista saatu PspA on suojaava, ja että on mahdollista sekoittaa suojaavia koostumuksia käyttäen mitä tahansa, kokeissa käytetyn kahdeksan erilaisen PspA:n joukosta valittua PspA-proteiinia tai näiden pspA-proteiinien mitä tahansa yhdistelmää. Samoin, PspA-proteiinit voidaan valita edellisessä esimerkissä tehdyn ryhmittelyn perusteella. Huomattakoon lisäksi, että kukin kannan R36A, BG9739, EF5668

ja DBL5 PspA on näiden tulosten perusteella sopiva koostumuksissa käyttöä ajatellen.

Huomautus siitä, miksi käytetään mieluumin mediaaneja kuin keskiarvoja

Hakijat päättivät ilmoittaa tulokset mediaanina (ei-parametrinen parametri) mieluumin kuin keskiarvoina, koska kuolemaa edeltänyt aika ei noudattanut normaalijakaumaa. Itse asiassa yleensä esiintyy kaksi piikkiä. Yksi niistä saadaan noin 3. tai 6. vuorokautena, kun suurin osa hiiristä kuolee, ja toinen saadaan ajanhetkellä >21 vrk, eloonjääville hiirille. Näin ollen keskiarvon laskeminen tällaisille arvoille kuten 21 tai 22 ja 3 tai 6 ei ole mielekästä. Yhdellä hiirellä, joka jää eloon viidestä, on valtava vaikutus tällaiseen keskiarvoon, mutta vain vähäinen vaikutus mediaaniin. Näin ollen mediaani on hyvä keino arvioida useimpien hiirten kuolemaa edeltävän ajan pituus.

Taulukko 30

Eri PspA-proteiinien suhteellinen kyky suojata yksittäisiä altistavia *S. pneumoniae*-kantoja vastaan
(Yhteenveto tilastollisesti merkittävästä suojasta)

			Rokote-PspA										
Altistava	kapseli-	*PspA*-	*pspA*-	R36A, Rx1, D39	JD908/WU2	JS1020/BG 9739	EF3296	EF5668	LB1905	JS5010.3 DBL5	JS3020 DBL6A	kaikki immuunit	paras suoja
kanta	tyyppi	tyyppi	tyyppi	K	a	b	E	DD	b	II	D	-	-
D39	2	25	K	++	+++			+				-	+++
WU2	3	1	a	+++	+++	+++		+++	+++	+++	+++	+++	+++
A66	3	13	a	+++	+++	+++		+++	+++	+++	+±	+++	+++
EF10197	3	18	M	+++		+++						+++	+++
ATCC6303	3	7	a	+++								+++	+++
BG9739	4	26	b	+	+++	+	0+	0	+±	0	0	++	+++
EF3296	4	20	E	+±	+±	0+				0	0	0	+±
EF5668	4	12	DD	+	0	+++	0+	+++	0+	+	0+	++	+++
LB1905	4	23	b	+	+	++	++	0	+	+±	+±	++	++
DBL5	5	33	II	+		+		+	+	++	0	++	++
EF6796	6A	1	C	+++								+++	+++
DBL6A	6A	19	D	+++	+±	++	+±	+++	+±	+±	+++	++	+++
BG9163	6B	21	C	+++		+++						+++	+++
BG7322	6B	24	C	+++	+++	+±	0	+++	+±	+++	+±	+++	+++

Huom. tyhjät ruudut tarkoittavat sitä, ettei yhtään koetta ole suoritettu. Lihavointi tarkoittaa merkittävä arvolla $P<0,05$, pieni lihavoitu kirjasin (+) tarkoittaa $0,02 \leq P < 0,05$, suuri lihavoitu kirjasin tarkoittaa $P < 0,02$. Tässä taulukossa tilastollinen merkittävyys viittaa kuoleman ajalliseen viivästymiseen, ellei alaviitteessä ole toisin esitetty (+). Kun kohdassa "kaikki immuunit" on esitetty merkittävä suoja kuolemalta, toisin kuin yksittäisten tulosten ruuduissa, niin tällöin "kaikki immuunit"-tulos on esitetty sarakkeessa paras suoja olettaen, että mikäli kussakin tulosruudussa olisi käytetty enemmän hiiriä, niin yhdessä tai useammassa niistä olisi todettu merkittävä suoja kuolemaa vastaan.

+++ tilastollisesti merkittävä suoja kuolemaa vastaan;
≥ 50 % oleva suoja kuolemaa vastaan;

++ tilastollisesti merkittävä suoja kuolemaa vastaan;
< 50 % oleva suoja kuolemaa vastaan;

+± tilastollisesti merkittävä kuoleman viivästyminen;
≥ suoja kuolemaa vastaan;

+ tilastollisesti merkittävä kuoleman viivästyminen;
< 20 % oleva suoja kuolemaa vastaan (tai merkittävä suoja kuolemaa vastaan, muttei kuoleman merkittävä viivästyminen)

0++ Ei tilastollista kuoleman ajallista viivästymistä;
mutta ≥ 50 % oleva suoja kuolemaa vastaan

0+ Ei tilastollista kuoleman ajallista viivästymistä; mutta kuolemaa edeltäneen ajan mediaani oli pidentynyt yli 1,5 vuorokautta tai ≥20 % oleva suoja kuolemaa vastaan.

0 Ei ilmeistä kuolemaa edeltäneen ajan pitenemistä tai suojaa kuolemaa vastaan.

Taulukko 31

Eri PspA-proteiinien suhteellinen kyky suojata kutakin altistavaa *S. pneumoniae*-kantaa vastaan
(Yhteenveto tilastollisesti merkittävästä suojasta)

			Rokote-PspA										
Altistava	kapseli-	*PspA*-	*pspA*-	R36A, Rx1, D39	JD908/WU2	JS1020/BG 9739	EF3296	EF5668	LB1905	JS5010.3 DBL5	JS3020 DBL6A	kaikki immuunit	kaikki vertailut
kanta	tyyppi	tyyppi	tyyppi	K	a	b	E	DD	b	II	D	-	-
D39	2	25	K	4,5	>21			4				5	2
WU2	3	1	a	>21	>21	>21		>21	>21	>21	>21	>21	2
A66	3	13	a	>21	>21	>21		>21	>21	>21	4	>21	2
EF10197	3	18	M	>21		>21						>21	2
ATCC6303	3	7	a	>21								>21	5
BG9739	4	26	b	3	>21	6	3	3	5,13	2	2	3	2
EF3296	4	20	E	5	5	4,5				2	2	3	2
EF5668	4	12	DD	6	2	>21	13	>21	4	>21	5	8	3
LB1905	4	23	b	5	5	8	6	3	5	3	3,5	5	2
DBL5	5	33	II	4		3		3	3,5	6	2	3,5	2
EF6796	6A	1	C	>21								>21	1
DBL6A	6A	19	D	>21	8,5	13	9	>21	8	12	>21	12,5	5,5
BG9163	6B	21	C	>21		>21						>21	8,5
BG7322	6B	24	C	>21	>21	14,5	6	>21	12,5	>21	11	>21	7

Eri PspA-proteiinien suhteellinen kyky suojata kutakin altistavaa *S. pneumoniae* -kantaa vastaan
(ilmoittaen niiden vuorokausien mediaanina, joiden vuorokausien ajan hiiret pysyivät elossa altistuksen jälkeen)

Huom. Lihavointi tarkoittaa tilastollisesti merkittävää elämän pitenemistä arvolla $P < 0,05$. Pieni kirjasin tarkoittaa $0,02 \leq P < 0,05$; suuri kirjasin tarkoittaa $P < 0,02$. Kuolemaa edeltävien vuorokausien mediaani, joka on esitetty muodossa 8, >21, tarkoittaa tilanteita, joissa mediaani ei ole jatkuvan arvojoukon sisällä. Näissä tapauksissa esitetyt numeroarvot ovat lähimpänä mediaania olevia arvoja. Näissä tapauksissa annetut arvot ovat lähimpänä laskettua mediaania. Murtolukuina olevat arvot kuten 3,5 tarkoittavat sitä, että mediaani on kahden luvun, tässä tapauksessa lukujen 3 ja 4 välissä. Kuten alkuperäisissä tiedoissa on esitetty (S103B), eräät kokeet päätettiin, ennenkuin injektiosta oli kulunut 21 vuorokautta. Ei ole kuitenkaan mitään syytä olettaa, että kokeen aikainen päättäminen olisi vaikuttanut merkittävällä tavalla tuloksiin, koska vain hyvin harvan, näissä tutkimuksissa käytetyillä kannoilla infektoidun hiiren on koskaan havaittu kuolevan myöhemmin kuin 10 tai 15 vuorokauden kuluttua infektiosta. Tilastollisista syistä kaikki, kokeen lopussa elävät hiiret katsottiin täydellisesti suojatuiksi, ja laskuja varten kaikkiin eloon jääneisiin hiiriin liitettiin arvoiksi >21.

Taulukko 32

Eri PspA-proteiinien kyky suojata kutakin altistavaa *S. pneumoniae*-kantaa vastaan
(ilmoittaen elossapysymisajan pitenemisenä, vuorokausina)
(A tarkoittaa ≥ 50 % immuuneista hiiristä elossa)

			Rokote-PspA										
Altistava	kapseli-	*PspA-*	*pspA-*	R36A, Rx1, D39	JD908/WU2	JS1020/BG 9739	EF3296	EF5668	LB1905	JS5010.3 DBL5	JS3020 DBL6A	kaikki immuunit	paras tulos
kanta	tyyppi	tyyppi	tyyppi	K	a	b	E	DD	b	II	D		
D39	2	25	K	2,5	A			2				3	A
WU2	3	1	a	A	A	A		A	A	A	2	A	A
A66	3	13	a	A	A	A		A	A	A	2	A	A
EF10197	3	18	M	A		A						A	A
ATCC6303	3	7	a	A								A	A
BG9739	4	26	b	1	A	4	1	1	3,11	0	0	1	A
EF3296	4	20	E	3	3	2,5				0	0	1	3
EF5668	4	12	DD	3	1	A	10	A	1	A	2	5	A
LB1905	4	23	b	3	3	6	4	1	3	1	1,5	3	6
DBL5	5	33	II	2		1		1	1,5	4	0	1,5	4
EF6796	6A	1	C	A								A	A
DBL6A	6A	19	D	A	3	7,5	3,5	A	2,5	6,5	A	7	A
BG9163	6B	21	C	A		A						A	A
BG7322	6B	24	C	A	A	7,5	-1	A	5,5	A	4	A	A
				R36A	WU2	BG9739	EF3296	EF5668	L81905	DBL5	DBL6A	A11	paras

Huom. Lihavointi tarkoittaa tilastollisesti merkittävää elämän pitenemistä arvolla $P < 0,05$. Pieni kirjasin tarkoittaa $0,02 \leq P < 0,05$; suuri kirjasin tarkoittaa $P < 0,02$. Muodossa 3, 9 tai 1,A esitetty elossapysymisajan pitenemisen mediaani tarkoittaa ryhmiä, joissa mediaani ei ole jatkuvan arvojoukon sisällä. Näissä tapauksissa annetut arvot ovat lähimpänä laskettua mediaania. Murtolukuina olevat arvot kuten 3,5 tarkoittavat sitä, että mediaani on kahden luvun, tässä tapauksessa lukujen 3 ja 4 välissä.

Taulukko 33

Eri PspA-proteiinien suhteellinen kyky suojata kutakin altistavaa *S. pneumoniae*-kantaa vastaan (ilmoittaen 21 vuorokautta altistuksen jälkeen elossa olevien hiirten prosentuaalisena osuutena)

			Rokote-PspA										
Altistava	kapseli-	*PspA-*	*pspA-*	R36A, Rx1, D39	JD908/WU2	JS1020/BG 9739	EF3296	EF5668	LB1905	JS5010.3 DBL5	JS3020 DBL6A	kaikki immuunit	kaikki vertailut
kanta	tyyppi	tyyppi	tyyppi	K	a	b	E	DD	b	II	D	-	
D39	2	25	K	38	60			30				38	3
WU2	3	1	a	100	100	100		100	100	100	100	100	1,5
A66	3	13	a	75	100	80		75	100	60	20	76	5
EF10197	3	18	M	100		80						90	0
ATCC6303	3	7	a	100								100	0
BG9739	4	26	b	11	60	13	25	0	25	0	0	12	0
EF3296	4	20	E	25	20	10				0	0	8	0
EF5668	4	12	DD	22	25	60	40	100	40	60	0	41	9
LB1905	4	23	b	10	0	31	40	0	0	14	0	14	0
DBL5	5	33	II	10		14		0	0	29	0	4	0
EF6796	6A	1	C	100								100	0
DBL6A	6A	19	D	67	25	33	0	60	25	0	80	35	4
BG9163	6B	21	C	89				80				86	20
BG7322	6B	24	C	100	60	25	0	89	25	80	25	55	6

Lihavointi tarkoittaa tilastollisesti merkittävää suojaa kuolemaa vastaan arvolla $P < 0,05$. Lihavoitu pieni kirjasin tarkoittaa merkittävää suojaa kuolemaa vastaan, kun $0,02 \leq P < 0,05$; lihavoitu suuri kirjasin tarkoittaa merkittävää suojaa kuolemaa vastaan, kun $P < 0,02$.

Taulukko 34

Eri PspA-proteiinien suhteellinen kyky suojata kutakin altistavaa *S. pneumoniae*-kantaa vastaan
(ilmoittaen kuolemalta suojattujen eläinten prosentuaalisena osuutena 21 vuorokautta altistuksen jälkeen)

			Rokote-PspA										
Altistava	kapseli-	*PspA-*	*pspA-*	R36A, Rx1, D39	JD908/WU2	JS1020/BG 9739	EF3296	EF5668	LB1905	JS5010.3 DBL5	JS3020 DBL6A	kaikki immuunit	kaikki vertailut
kanta	tyyppi	tyyppi	tyyppi	K	a	b	E	DD	b	II	D	-	
D39	2	25	K	36	59			28				36	59
WU2	3	1	a	100	100	100		100	100	100	100	100	100
A66	3	13	a	71	100	79		74	100	58	16	75	100
EF10197	3	18	M	100		80						90	100
ATCC6303	3	7	a	100								100	100
BG9739	4	26	b	11	60	13	25	0	25	0	0	12	60
EF3296	4	20	E	25	20	10				0	0	8	25
EF5668	4	12	DD	14	18	56	34	100	34	56	-10	35	100
LB1905	4	23	b	10	0	31	40	0	0	14	0	14	40
DBL5	5	33	II	10		14		0	0	29	0	4	29
EF6796	6A	1	C	100								100	100
DBL6A	6A	19	D	66	22	30	-4	58	22	-4	79	33	79
BG9163	6B	21	C	86		75						83	86
BG7322	6B	24	C	100	57	22	0	88	22	79	22	52	100

Lihavointi tarkoittaa tilastollisesti merkittävää suojaa kuolemaa vastaan arvolla $P < 0,05$. Lihavoitu pieni kirjasin tarkoittaa merkittävää suojaa kuolemaa vastaan, kun $0,02 \leq P < 0,05$; lihavoitu suuri kirjasin tarkoittaa merkittävää suojaa kuolemaa vastaan, kun $P < 0,02$. Suojattujen hiirten % osuutta on korjattu vertailuhiirten joukossa mahdollisesti eloonjääneiden suhteen.

Suojatut, % = 100 x (% elossa immunoiduista x % elossa vertailuista)/(100 - % elossa vertailuista). Niinpä, jos vertailuhiirten joukossa oli yksikin elävä hiiri, niin tällöin laskemalla saatu arvo "suojatut, %" oli pienempi kuin todettu, edellisesssä taulukossa esitetty arvo "elossa, %" Ainoa poikkeus tähän on se tapaus, että 100 % immunoiduista hiiristä oli elossa. Negatiiviset arvot tarkoittavat, että elossa oli vähemmän immunoituja hiiriä kuin vertailuhiiriä. Huomaa, ettei yksikään näistä negatiivisista arvoista ole merkittävä, vaikka tässä käytettiin yksiosaista testiä.

Taulukko 35

Suositeltavat immunogeenit suojan aikaansaamiseksi mainittuja altistavia *S. pneumoniae*-kantoja vastaan: perustuen suojan arviointiin perustuen niiden vuorokausien mediaaniin, joiden vuorokausien ajan hiiret pysyivät elossa altistuksen jälkeen, sekä suojattujen hiirten prosentuaaliseen osuuteen (numerot viittaavat edullisuuteen rokotekantana käyttöä ajatellen esitettyyn altistavaan kantaan nähden, 1 = paras)

			Rokote-PspA								
Altistava	kapseli-	*PspA*-	*pspA*-	R36A, Rx1, D39	JD908/WU2	JS1020/BG 9739	EF3296	EF5668	LB1905	DBL5 JS5010.3	DBL6A JS3020
kanta	tyyppi	tyyppi	tyyppi	K	a	b	E	DD	b	II	D
D39	2	25	K	2	1			3			
WU2	3	1	a	1	1	1		1	1	1	1
A66	3	13	a	2	1	2		2	1	3	0
EF10197	3	18	M	1		2					
ATCC6303	3	7	a	1							
BG9739	4	26	b	3	1	2	3	3	2	0	0
EF3296	4	20	E	1	1	2				0	8
EF5668	4	12	DD	0	0	2	3	1	0	2	0
LB1905	4	23	b	2	0	1	1	0	0	0	0
DBL5	5	33	II	2		3		0	3	1	0
EF6796	6A	1	C	1							
DBL6A	6A	19	D	2	0	3	0	2	0	0	1
BG9163	6B	21	C	1		1					
BG7322	6B	24	C	1	2	3	0	1	3	1	3
1:n lukumäärä				7	5	3	1	3	2	3	2

Lihavointi tarkoittaa tilastollisesti merkittävää suojaa kuolemaa vastaan, kun $P < 0,05$. Mikäli useampi kuin yksi PspA oli yhtä hyvin suojaava, niin niille jokaiselle annettiin sama arvo. Suositukset perustuvat kuolemaa edeltäviin vuorokausiin ja prosentuaaliseen suojaan, erityisesti silloin, kun yli 50 % hiiristä oli elossa 21 vuorokauden jälkeen. "0" tarkoittaa, että koe toteutettiin, mutta tämä PspA ei ollut suositeltava muihin PspA-proteiineihin verrattuna.

Johtopäätökset:
Tilastollisesti merkittävä suoja kuolemaa vastaan,
suoja yli 50 %; 11/14 kannoista = 79 %
Tilastollisesti merkittävä suoja kuolemaa vastaan,
13/14 kannoista = 93 %
Tilastolisesti merkittävä elämän piteneminen,
14/14 kannoista eli 100 % kannoista.

Taulukko 36

Paras valinta rokotekomponenteiksi suhteessa 95/8/27						
	Rokotekomponentti (suojatut kumulatiiviset kannat) mahdollisimman hyvä suoja, %					
Arvosteluperuste	1	2	3	4	5	6
≥ #1 PspA kunkin altistavan kannan tapauksessa	R36A (7) 50 %	WU2 (10) 71 %	BG9739* (11) 79 %	EF5668 (12) 86 %	DBL5 (13) 93 %	DBL6A (14) 100 %
≥ #2 PspA kunkin altistavan kannan tapauksessa	R36A (12) 86 %	BG9739 (12) 100 %				
Suurin arvosana (+) tyyppiarvosana	R36A (9) 64 %	WU2 (11) 79 %	BG9739 (13) 92 %	DBL5 (14) 100 %		
Elossapysymispäivien suurin kasvu	R36A (9) 64 %	WU2 (13) 79 %	BG9739 (13) 92 %	DBL5 (14) 100 %		
Suojattu, %	R36A (7) 50 %	WU2 (10) 64 %	DBL5 (11) 79 %	EF5668 (12) 86 %	DBL6A (13) 92 %	EF3296 (14) 100 %
Teoreettinen seos, joka perustuu muutamaan testattavaan oletukseen (katso alla)	R36A (10) 64 %	BG9739 (12) 86 %	DBL5 (13) 92 %	EF3296 (14) 100 %		

* Tämä ei ole ainutlaatuinen yhdistelmä. katso alla oleva taulukko.

Taulukko 37

Yhdistelmät, joissa kaikkien altistavien kantojen tapauksessa rokotekannan arvosana on ≥#2.				
PspA-proteiinien lkm yhdistelmässä	Yhdistelmä	#1-kantojen lkm.	#1:t yhteensä	#1:t ja #2:t yhteensä
2	R36A + BG9739	8	10	20
3	R36A + BG9739 + WU2	11	15	25
3	R36A + WU2 + DBL5	11	15	21
3	R36A + WU2 + EF5668	11	15	23
3	R36A + WU2 + DBL5	11	15	22

Taulukko 38

Eri PspA-proteiinien tuottama suoja D39-kantaa vastaan: yhdistetyt tulokset; Ne vrk:t, jolloin kukin hiiri vielä elossa							
			Vrk:t ennen kuolemaa/immunogointi				
Koe	Log CFU D39	Hiiret	Rx1/R36A D39	JD908 (WU2)	EF5668	Kaikki immuunit	Vertailu
143	4,5	CBA/N			1,1,2,2,2		1,1,2,2,3
E145	4,0	CBA/N	2,3,3,3,4				1,1,2,3,4
E028 BCG	5,93	BALB/c	3,3x >21				2,2,2,4
E143	3,0	CBA/N			2,6,3x>10		3.3.5.5
E140 BC100	2,81	CBA/N	4,4,5,7,15				2,2,2
E169	2,7	CBA/N	2,4x>21	2,5,3x>21			1,2,2,2,3
E154	2,6	CBA/N	2,2,3,2x>21				4x1, 6x2,3,3,4
kaikki ≤3,0			2,3,3,3,4,4,4, 5,7,15		1,1,2,2,2		4x1, 6x2,3,4
kaikki			4x2, 5x3, 3x4, 5,6,15, 9x>21	2,5,3x>21	1,1,2,2,2,2,6, 3x>21	1,1,9x2,5x3,3x 4,5,5,6,7,15, 15x>21	5x1, 16x2,6-x3,4, 4,5,5,5,>21

Taulukko 39

Eri PspA-proteiinien tuottama suoja D39-kantaa vastaan: yhdistetyt tulokset;
Elossapysymisvuorokausien mediaani & elävät:kuolleet (a:d) sekä vastaavat P-arvot

Koe	Log CFU	Hiiret	Rx1/R36A D39		JD908 (WU2)		EF5668		kaikki immuunit		Vertailu	
	D39	CBA/N	med	a:d	med	a:d	med	a:d	med	a:d	med	a:d
143	4,5	CBA/N					2 e.m.	0,5			2	0:5
E145	4,0	BALB/c	3 n.s.	0,5							2	0:5
E028 BCG	5,93	CBA/N	>21 0,029	3:1 e.m.							2	0:4
E143	3,0	CBA/N					>21 e.m.	3:2 e.m.			3	0:5
E140 BC100	2,81	CBA/N	5 0,018	0:5							2	0:3
E169	2,7	CBA/N	>21 0,016	4:1 0,024	>21 0,016	3:2 e.m.					2	0:5
E154	2,6	CBA/N	>3 e.m.	2:3 e.m.							2	1:5
A# ≤3,0			4 0,008	0:10			2 e.m.	0:5			2	0:13
kaikki			4,5 0,0057	9:15 0,001 ++	>21 0,0006	3:2 0,0045 +++	4[2,6] e.m.	3:7 0,034 +	5 0,0001	15:24 0,0002 ++	2	1:32
% elossa				38		60		30		38		3
				36		59		28		36		
			Rx1/D39		/WU2		EF5668		kaikki immuunit		vertailut	

Taulukko 40

Eri PspA-proteiinien tuottama suoja WU2-kantaa vastaan												
Koe	CFU WU2	Hiiret	Kuolemaa edeltävät vuorokaudet/immunogeeni									
			FL-R36A	Rx1 BC100	JD106 (WU2)	JS108 (BG9739)	BG9739 bc100	EF5669	L81905 bc100	DBL5 bc100	JS3020 (DBL6A)	vertailu
Dr. Ed, expt.											+++	
Aikaisempien kokeiden erät			+++									
E012	3,0	CBA/N	15x>21									
E028	6,01	BALB/c	4x>21 0,005/e.m.			3x>15						1,1,11x2,73,4
E084	3,75[1]	CBA/N					4x>21		4x>21	4x>21		4,6,6,>21
E125 bc100	3,57	CBA/N				5x>23						2,2,3,3,3,>21
E129	3,18	CBA/N										2,2,2,2,3
E140 BC100	3,43	CBA/N		4x>21								1,5x2,3,4
E143	3,0	CBA/N						8x>10				1,1,2,2,3
E144	3,9	CBA/N									5x>21	5x2
E172	3,98	CBA/N			5x>21							5x3
kaikki			19x>21	4x>21	5x>21	8x>21	4x>21	8x>21	4x>21	4x>21	5x>21	6x1,33x2, 20x3,4, 4,4,6,6,>21
kaikki imuunit												

Taulukko 41

Eri PspA-proteiinien tuottama suoja WU2-kantaa vastaan: yhdistetyt tulokset;												
Koe	CFU WU2	Hiiret	Elossapysymisuorokaudet, mediaani - elävät:kuolleet (a:d) - P-arvot suhteen elävät:kuolleet perusteella P-arvo laskettu yhdistettyihin vertailuihin verrattuna (tässä tapauksessa 65 vertailuhiirtä) ARVOSANA									
			FL-R36A	Rx1 BC100	JD106 (WU2)	JS108 (BG9739)	BG9739 bc100	EF5669	L81905 bc100	DBL5 bc100	JS3020 (DBL6A)	vertailu
Dr. Ed, expt.											+++	
Aikaisempien kokeiden erät			+++									
E012	3,0	CBA/N	15x>21									1,1,11x2,73,4
E028	6,01	BALB/c	4x>21 0,005/e.m.			3x>15						4,6,6,>21
E084	3,75[1]	CBA/N					4x>21		4x>21	4x>21		1,2,2,2,3,3,3, >21
E125 bc100	3,57	CBA/N				5x>23						2,2,3,3,3,>21
E129	3,18	CBA/N										2,2,2,2,3
E140 BC100	3,43	CBA/N		4x>21								1,5x2,3,4
E143	3,0	CBA/N						8x>10				1,1,2,2,2,3
E144	3,9	CBA/N									5x>21	5x2
E172	3,98	CBA/N		5x>21	5x>21							5x3
			>21 19:0 >0,0001 +++	>21 19:0 >0,0001 +++	>21 19:0 >0,0001 +++	>21 19:0 >0,0001 +++	>21 19:0 >0,0001 +++	>21 19:0 >0,0001 +++	>21 19:0 >0,0001 +++	>21 19:0 >0,0001 +++	>21 19:0 >0,0001 +++	2 1:64
% elossa			100	100	100	100	100	100	100	100	100	2

Eri PspA-proteiinien tuottama suoja A66-kantaa vastaan: yhdistetyt tulokset;														
Koe	CFU A66	Hiiret	Kuolemaa edeltävät vuorokaudet/immunogeeni											
			FL-R36A/D39	Rx1 BC100	JD106 (WU2)	JS108 (BG9739)	BG9739 bc100	EF5668	L81905 FL	L81905 bc100	JS5010.3 FL (DBL5)	DBL5 bc100	JS3020 (DBL6A)	vertailu
P-arvot			<0,0001 <0,0001 0,0001		<0,0001 <0,0001	0,004 0,0075	0,0002 <0,0001	0,0006 0,006	<0,0001 <0,0001	0,0002 0,0001	0,0025 n.s.	0,0002 0,0001	0,015 n.s.	
Pienet yhdistelmät			R36A/Rx1/WG44.1		JD908	BG9739		EF5668	L81905		DBL5 3,4,4,6x>21		DBL6A	vertailu
			>21 18:6		>21 5:0	>21 8:2		>21 4:1	>21 9:0		>21 6:4		4 1:4	2 2:36
P-arvot sija/a:d			<0,0001		<0,0001 <0,0001	<0,0001		0,0006 0,006	<0,0001		0,0004		0,015 n.s.	
Arvosana % elossa			+++ 72 71		+++ 100 100	+++ 80 79		+++ 75 74	+++ 100 100		+++ 60 58		+++ 20 16	5 0
A66 altistus			R36A7Rx1/WG44.1		JD908	BG9739		EF5668	L81905		DBL5		DBL6A	

Eri PspA-proteiinien tuottama suoja WU2-kantaa vastaan: yhdistetyt tulokset;											
Koe	CFU WU2	Hiiret	Elossapysymisuorokaudet, mediaani - elävät:kuolleet (a:d) - P-arvot suhteen elävät:kuolleet perusteella P-arvo laskettu yhdistettyihin vertailuihin verrattuna (tässä tapauksessa 65 vertailuhiirtä) ARVOSANA									
			FL-R36A	Rx1 BC100	JD108 (WU2)	JS1020 (BG9739)	BG9739 bc100	EF5668	L81905 bc100	DBL5 bc100	JS3020 (DBL6A)	vertailu
			FL-R36A	Rx1 BC100	JD108 (WU2)	JS1020 (BG9739)	BG9739 bc100	EF5668	L81905 bc100	DBL5 bc100	JS3020 (DBL6A)	vertailu

WU2-altistus	kuolemaa edeltävät vrk:t	kuolemaa edeltävät vrk:n mediaanit	elävät: kuolleet	P-arvo kuolemaa edeltävien vuorokausien perusteella	P-arvo suhteen elävät:kuolleet perusteella	Score	% elossa	% suojattu
kaikki imuunit	61x>21	>21	61:0	>0,0001	>0,0001	+++	100	100
kaikki vertailut	6x1,33x2,20x3,4, 4,4,6,6,>21	2	1.&4				2	2

Taulukko 42

Eri PspA-proteiinien tuottama suoja WU2-kantaa vastaan: yhdistetyt tulokset;														
Koe	CFU A66	Hiiret	Kuolemaa edeltävät vuorokaudet/immunogeeni											
			FL-R36A/ D39	Rx1 BC100	JD106 (WU2)	JS108 (BG9739)	BG9739 bc100	EF5668	L81905 FL	L81905 bc100	JS5010.3 FL (DBL5)	DBL5 bc100	JS3020 (DBL6A)	vertailu
E169	2,60	CBA/N	5x>21		5x>21									1,1,2,2,6
E152 bc100	2,78	CBA/N					4x>21			4x>21		4x>21		3x2,2,3,6,6, >21
E104	3,0	CBA/N				2,8,3x>22					3,4,4, 2x>21		2,4,54, 5,>21	2,2,2,2,3
E143	3,0	CBA/N						4,4x>10						2,2,3,3
E140	3,43	CBA/N		4x>21										1,1,1
E172	3,94	CBA/N							5x>21					
E145	3,97	CBA/N	13,4x>21											1,2,2,2,4
E121	4,16	CBA/N	3x3,2x4,5x >21											1,8x2,>21
kaikki			3x3,2x4,1 3,14x>21	4x>21	5x>21	2,8,3x>21	4x>21	4,4x>21	5x>21	5x>21	3,4,4, 2x>21	4x>21	2,4,4, 5,>21	7x1,22x2, 3x3,4,,3x6, 2x>21
mediaani; A:D			>21 14:6	>21 4:0	>21 5:0	>21 3:2	>21 5:0	>21 4:1	>21 5:0	>21 4:0	4 2:3	4x>21 4:0	4 1:4	2 2:36

A66-altistus	kuolemaa edeltävät vrk:t	kuolemaa edeltävät vrk:n mediaanit	elävät: kuolleet	P-arvo kuolemaa edeltävien vuorokausien perusteella	P-arvo suhteen elävät:kuolleet perusteella	Score	% elossa	% suojattu
kaikki imuunit	2,2,4x3,7x3,5,8, 13,50x>21	>21	50:16	<0,0001	<0,0001	+++	76	75
kaikki vertailut	7x1,22x2,3x3,4, 3x6,2x>21	2	2:36				5	0

Taulukko 43

Eri PspA-proteiinien tuottama suoja EF10197-kantaa vastaan: yhdistetyt tulokset									
Koe	CFU EF 10197	Hiiret	Kuolemaa edeltävät vuorokaudet/immunogeeni						
			Rx1 BC100	JS1020 (BG9739)	L81905	JS3020 DBL6A)	EF5668	JS5010.3 FL (DBL5)0	vertailu
E140	3,00	CBA/N	5x>21						2,2,2
MI BCG	2,70	CBA/N	*						2,2,2,2,2
E129	3,34	CBA/N		8,4x>23					2,2,2,2,9

* puuttuu teksti

Taulukko 44

Suoja EF10197-kantaa vastaan; yhdistämällä saatujen tulosten yhdistelmä					
linja	ryhmän kuvaus	Kuoleman viivästyminen ja/tai eloonjääminen		Eloonjääminen	
		kuolemaa edeltävät vuorokaudet (mediaani)	*P*-arvot jne.	elossa:kuollut	*P*-arvot jne.
1a	Rx1 (E140)	5x >21	0,017 vs 1b 0,0013 vs 4b	5:0	0,018 vs 1b 0,0008 vs 4b
3a	JS1020 (E129)	8, 4x >23	0,0007 vs 3b	4:1	0,024 vs 3b
4a	kaikki immuunit	8, 9x >21	< 0,0001 vs 4b	9:1	0,0002 vs 4b
1b	Rx1 vertailut (E140)	2,2,2		0:3	
2b	MI BCG	2,2,2,2,2		0:5	
3b	JS1020 (vert. (E129)	2,2,2,2,9		0:5	
4b	kaikki vertailut (ilman MI BCG)	2,2,2,2,2,2,2,9		0:8	

Taulukko 45

Yhteenveto suojasta EF10197-kantaa vastaan							
Immunogeeni	elossa:kuollut	% elossa	% suojatu	median DOD	*P* aika elossa	*P* elossa:kuollut	arvosana*
Rx1	5:0	100	100	>21	0,017	0,018	+++
JS1020	4:1	80	80	>21	0,0007	0,024	+++
kaikki immuunit	9:1	90	90	>21	<0,0001	0,0002	+++
kaikki vertailut	0:8	0	0	2	-	-	-

Taulukko 46

Eri PspA-proteiinien tuottama suoja ATCC6303-kantaa vastaan: yhdistetyt tulokset									
Koe	CFU ATCC 6303	Hiiret	Kuolemaa edeltävät vuorokaudet/immunogeeni						
			Rx1 BC100	JS1020 (BG9739)	L81905	JS3020	EF5668	JS5010.3FL (DBL5)0	vertailu
E140	2,30	CBA/N	5x >21						4,4x5
E129	3,80	CBA/N		n.v.					

Taulukko 47

Suoja kantaa ATCC6303 vastaan, yhdistämällä saatujen tulosten yhdistelmä					
	ryhmän	Kuoleman viivästyminen ja/tai eloonjääminen		Eloonjääminen	
linja	kuvaus	kuolemaa edeltävät vuorokaudet (mediaani)	*P*-arvot jne.	elossa:kuollut	*P*-arvot jne.
1a	Rx1 (E140)	5x>21 (>21)	0,0040	5:0	0,0004
1b	Rx1 vertailut (E140)	4,4x5 5	-	0:5	-

Taulukko 48

Summary of protection against ATCC6303							
Immunogeeni	elossa:kuollut	% elossa	% suojattu	median DOD	*P* aika elossa	*P* elossa:kuollut	Arvosana*
Rx1	5:0	100	100	>21	0,004	0,004	+++
Rx1 vertailut	0:5	0	0	5	-	-	-

* +++ = puuttuu

Taulukko 49

Täysipituisten PspA-proteiinien tuottaman suoja BG9739-kantaa vastaan: yhdistetyt tulokset														
Koe	CFU BG9739	Hiiret	Kuolemaa edeltävät vuorokaudet/immunogeeni											
			R36A FL	BC100 (Rx1)	JD908 (WU2)	JS1020 (BG9739)	bc100 (BG9739)	EF3296 FL	EF5668 FL	bc100 (L81905)	JS5010.3 FL (DBL5)	bc100 (DBL5)	JS3020 (DBL6A)	vertailu
E140	2,76	CBA/N		3,3, 10,11										2,2,3
E104	2,89	Xid				6,6,7,8,8					2,2,2,3,4		2,2,2,2,3	2,2,3,5,5
E125	3,56	CBA/N					5,5,5,7			4,5,13, >21		2,2,2,4		3,3,4, 4,5,6
E172	3,71	CBA/N			6,7,3x>21									3,4,6,6,7
E124	3,76	Xid									2,2,2,2,3		2,2,2,2,9	2,2,2,2,2
E084	4,05	BALB/c				4x2,2, x>14								9x2
E144	4,09	Xid	2,3,6, >21					2,3,3,7, >10	2,3,3, 3,3,4					2,2,2,3,3
kaikki			2,3,6 >21	3,3,10,11	4x2,6,6,7, 8,8,2x>21	4x2,6,7,8, 8,8,8,2x >21	5,5,5,7	2,3,7,7, >21	2,3,3,4		7x2,3,3,4		8x2,3,9	21x2, 7x1,3x4, 3x5, 3x6,7
mediaani			3	3,10	6	6	5	3	3	5,13	2	2	2	2
a:d			1:4	0:4	2:9	2:9	0:4	1:4	0:5	1:3	1:10	0:4	0:10	0:38
P rank														
P a:d														

Taulukko 50

Täysipituisten PspA-proteiinien tuottaman suoja BG9739-kantaa vastaan: yhdistetyt tulokset														
Koe	CFU BG9739	Hiiret	Kuolemaa edeltävät vuorokaudet/immunogeeni											
			R36A FL	BC100 (Rx1)	JD908 (WU2)	JS1020 (BG9739)	bc100 (BG9739)	EF3296 FL	EF5668 FL	bc100 (L81905)	JS5010.3 FL	bc100 (DBL5)	JS3020 (DBL6A)	vertailu
E140	2,76	CBA/N		3,3,10, 11										2,2,3
E104	2,89	Xid				6,6,7,8,8					2,2,2,3,4		2,2,2,2,3	2,2,3,5,5
E125	3,56	CBA/N					5,5,5,7			4,5,13, >21		2,2,2,4		3,3,4, 4,5,6
E172	3,71	CBA/N			6,7,3x>21									3,4,6,6,7
E124	3,76	Xid									2,2,2,2,3		2,2,2,2,9	2,2,2,2,2
E084	4,05	BALB/c												9x2
E144	4,09	Xid	2,3,6, >2,1					2,3,7, >10	2,3,3, 3,4					2,2,2,3,3

Täysipituisten PspA-proteiinien tuottaman suoja BG9739-kantaa vastaan bc100:lla: yhdistetyt tulokset														
	CFU	Hiiret	Kuolemaa edeltävät vuorokaudet/immunogeeni											
Koe	BG9739		R36A FL	BC100 (Rx1)	JD908 (WU2)	JS1020 (BG9739)	bc100 (BG9739)	EF3296 FL	EF5668 FL	bc100 (L81905)	JS5010.3 FL (DBL5)	bc100 (DBL5)	JS3020 (DBL6A)	vertailu
FL + bc100 BG9739			R36A/Rx1/D39		WU2	BG9739		EF3296	EF5668	L81905	DBL5		DBL6A	Vert.
kaikki			2,4x3,6,10,11,>21		6,7,3x >21	4x2,3x5,2x6,2x7,2x8, 2x>21		2,3,7, >21	2,3x3,4	4,5,13, >21	10x2,3,3,4,4		8x2,3,9	21x2, 7x3,3x4, 3,3x5, 3x6,7
mediaani päiviä elossa			3		>21	6		3	3	5,13	2		2	2
elossa:kuollut			1:8		3:2	2:13		1:4	0:5	1:3	0:14		0:10	0:38
P - päiviä elossa			0,0096		<0,0001	0,0013		n.s.	n.s.	0,0022	n.s.		n.s.	
P - elossa:kuollut			n.s.		0,0008	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	
Arvosana			+		+++	+		0+	0	0	0		0	
% elossa			11		60	13		25	0	0	0		0	0
% suojattu			11		60	13		25	0	0	0		0	0
BG9739 altistus			R36A/Rx1/D39		WU2	BG9739		EF3296	EF5668	DBL5	DBL5		DBL6A	Vert.

BG9739	päiviä kuolemaan	mdiaanipäiviä kuolemaan	elossa: kuollut	*P*-arvo perustuen päiviin ennen kuolemaa	*P*-arvo perustuen eläviin tai kuolleisiin	Arvosana	% elossa	%	
kaikki immuunit		3	8,59	0,0009	0,023	++	12	12	
kaikki vertailut		2	0:38						

Taulukko 51

Eri PspA-proteiinien tuottama suoja EF3296-kantaa vastaan: yhdistetyt tulokset								
Koe	CFU EF3296	Hiiret	Kuolemaa edeltävät vuorokaudet/immunogeeni					
E84[1]	3,99	BALB/c			4x2, >4			9x2
E140	2,92	CBA/N	3,4,6,>21					3,3,3
E104	3,11	CBA/N			4,5,5,5,6	2,2,2,3,3	2,2,3,4,5	2,2,2,3,4
E124	3,94	CBA/N				1,1,2,2,2	1,1,2,2,2	1,1,2,2,2
E172	4,06	CBA/N						3,4x6
kaikki			3,4,6,>21	3,3,5,5,>21	4x2,4,3x5, 6,>21	1,1,5x2,3,3	1,1,5x2,3,4,5	1,1,15x2, 5x3,4,4x6
Kuolemaa edeltävät vuorokaudet, mediaani			5	5	4,5	2	2	2
Elävät:kuolleet			1:3	1:4	1:9	0:9	0:10	0:27
P - kuolemaa edeltävät vuorokaudet			0,0077	0,0094	n.s.	n.s.	n.s.	
P - elävät:kuolleet			n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Arvosana			+ ±	+ ±	0+	0	0	
% elossa			25	20	10	0	0	0
% suojattu								
Paras								
EF3296 altistus			Rx1 BC100	JD908 WU2	JS1020 (BG9739)	JS5010.3FL (DBL5)	JS3020 DBL6A)	vertailu

EF3296 altistus	mediaani päiviä elossa	elossa: kuollut	*P*- päiviä kuolemaan	*P* - elossa: kuollut	Arvosana %	% elossa	% suojattu
kaikki immuunit	3	3:35	n.s.	n.s.	0	8	8
kaikki vertailut	2	0:27					

Taulukko 52

Eri FL-PspA- ja bc100-proteiinien tuottama suoja EF5668-kantaa vastaan: yhdistetyt tulokset												
Koe	CFU EF5668	Hiiret	Kuolemaa edeltävät vuorokaudet/immunogeeni									
			R36A	Rx1 BC100	JD908 (WU2)	JS1020 (BG9739)	EF3296	EF5668	L81905	JS5010.3 FL DBL5	JS3020 DBL6A	vertailu
E143	3,0	CBA/N						5x>10				1,1,2,2,>10
E140	3,59	CBA/N		4,6,12>21								2,4,6
E171	3,69	CBA/N			2,2,2,3>21				3,3,4,2x>21			1,3,66,7
E124	3,90	CBA/N								3,3,3x>21	3,4,5,6,6	3,3,34,9
E146	3,94	CBA/N	3,4,416>19			2,10,3x>21	2,4,13,2x>21					2,3,34>21
Yhdistetyt			3,3x4,6,12,16,2x>21		2,2,2,3,>21	2,10,3x>21	2,4,13,2x>21	5x>21	3,3,4,2x>21	3,3,3x>21	3,4,5,6	3x1,4x2,6 x3,3x4,3x6, 7,9,2x>21
mediaani päiviä elossa			8		2	>21	13	>21	4	>21	5	3
elävät:kuolleet			2:7		1:4	3:2	2:3	5:0	2:3	3:2	0:5	2:21
P - days alive			0,013		n.s.	0,0187	n.s.	0,001	n.s.	n.s.	n.s.	
P - elävät:kuolleet			n.s.		n.s.	0,025	n.s.	0,0002	n.s.	0,027	n.s.	
Arvosana			+		0	+++	0+	+++	0+	+	0+	
% elossa			22		25	60	40	100	40	60	0	9
% suojattu			14		18	56	34	100	34	56	0,10	9
EF5668			R36A/Rx1/D39		WU2	BG9739	EF3290	EF5668	L81905	DBL5	DBL6A	vertailu

Yhteenveto suojasta EF6796 vastaan						
Immunogeeni	elossa:kuolleet	% elossa	% suojattu	mediaani DOD	*P* - aika elossa	*P* - elossa vs. kuollut
Rx1	4:0	100	100	>21	0,029	0,029
vertailut	0:3	0	0	1	--	--

Taulukko 53

Eri FL PspA- ja bc100-PspAproteiinien tuottama suoja DBL6A-kantaa vastaan: yhdistetyt tulokset

Koe	CFU DBL6A	Hiiret	Kuolemaa edeltävät vuorokaudet/immunogeeni												
			BC100 Rx1	R36A	JD908 WU2	JS1020 BG9738	bc100 BG9739	EF3296	EF5668	L81905 FL	bc100 L81905	JS5010.3 DBL5	bc100 DBL5	JS2030 DBL6A	vertailu
E171	2,69	CBA/N			6,7,8, 9,>21					3,3,7,9, >21					2,3,4,6,6
E152	3,24	CBA/N					15,3x>21				7,16,2x >21		8,10,13,21		3x3,4,3x6
E140	3,25	CBA/N	4x>2 1												4,7,7
E146	3,57	CBA/N		7,8,10 2x>21				6,8,9,10, 10	10,13,3x >21			7,8,12, 13,13		9,4x>21	4,45,5,18
E129	4,14	CBA/N				3,6,8,10,13									4,5,6,8,>23
Yhteensä															

Yhdistelmien nimet	R36A/Rx1/D39	WU2	BG9739	EF3296	EF5668	L81905	DBL5	DBL6A	vertailut
Yhdistetty data	7,9,10,6x>21	6,8,9, >21	3,6,8,10,13,15,3x>21	6,8,9,10,10	10,13,3x >21	3.3.7.7.8.16.2x>21	7,8,8,10,12,3x13,21	9,4x>21	2,4x3,6x4,3x5, 6x6,7,8,18,>21
Mediaani päiviä elossa	>21	8,5	13	9	>21	8	12	>21	5
elävät:kuolleet	6:3	1:3	3:6	0:5	3:2	2:6	0:9	<0,0001	1:24
P-päiviä elossa	<0,0001	0,0082	0,0025	0,0038	0,0001	0,037	0,002	0,0009	
P - elävät:kuolleet	0,0019	n.s.	0,048	n.s.	0.0093	n.s.	n.s.	+++	
Arvosana	+++	+±	++	++	+++	++	++		
	7	25	33	0	60	25	0	80	4
	66	22	30	4	58	22	4	79	0
DBL6A	R36A/Rx1/D39	WU2	BG9739	EF3296	EF5668	L81905	DBL5	DBL6A	vertailut

DBL6A	Päivät kuolemaan	mediaani päiviä kuolemaan	elävät:kuolleet	*P*-arvo perustuen päiviin ennen kuolemaa	*P*-arvo perustuen elävät:kuolleet	Arvosana	% elossa	% suojattu
kaikki immuunit		12,5	19:35	<0,0001	0,0019	++	35	33
kaikki vertailut		5	1:24					

Taulukko 54

Eri PspA-proteiinien tuottama suoja EF3296-kantaa vastaan: yhdistetyt tulokset							
Koe	CFU BG9163	Hiiret	Kuolemaa edeltävät vuorokaudet/immunogeeni				
			Rx1	Rx1.BGC	JS1020 (BG9739)	kaikki immuunit	vertailu
E169	2,67	CBA/N	5x>24				4,5,8,8,>24
E140	3,14	CBA/N	n.v.				
E129	4,0	CBA/N			12,4x>23		7,9,9,13,>23
E028	6,217	CBA/N		6,3x>21			5,6,7,10
Immunogeenit			Rx1/R36A/D39		BG9739	kaikki imuunit	vertailu
Yhdistetty data			6,8x>21		12,4x>21	6,12,12x>21	4,5,6,7,7,9,9,12,2x>21
Mediaani päiviä elossa			>21		>21	>21	8,5
elävät:kuolleet			8:1		4:1	12:2	2:8
P-päiviä elossa			0,0086		0,0097	0,0027	
P - elävät:kuolleet			0,0045		0,047		0,0022
% elossa			89		80	86	20
% suojattu			86		75	83	0
arvosana			+++		+++	+++	
BG9163 altistus			Rx1/R36A/D39		BG9739	kaikki immuunit	vertailu

EF5668	päivät kuolemaan	mediaani päiviä elossa	elossa: kuollut	*P*-päiviä kuolemaan	*P* - elossa: kuollut	Arvosana %	% elossa	% suojattu
kaikki immuunit		8	18:26	0,0015	0,005	++	41	35
kaikki vertailut		3	2:21					

Taulukko 55

Eri FL-PspA -proteiinien tuottama suoja L81905-kantaa vastaan: yhdistetyt tulokset														
Koe	CFU L81905	Hiiret	Kuolemaa edeltävät vuorokaudet/immunogeeni											
			R36A	BC100 (Rx1)	JD908 (WU2)	JS1020 (BG9379)	BC100	EF3296	EF5668	bc100 L81905	JS5010.3 (DBL5)	bc100 (DBL5)	JS3020 (DBL6A)	vertailu
E172	2,45	CBA/N			3,4,5,6,6									3,3,4,4,4
E140	3,11	CBA/N		2,5,5,6,8										2,2,2,3,3
E084	3,86	BALB				2,2,5x > 14								1,8x2
E104	·3,5	CBA/N				3,7,8,8,11					3,3,3,2x > 22		3,4,5,5,6	2,4,4,4,5
E124	·3,5	CBA/N									2,2,2,2,3		2.2.2.3.5	1,2,2,2,2
E125	3,6	CBA/N					5,6,8,8			3,4,6,8		4,5,5,5		2,2,3,5,5,5
E144	4,11	CBA/N	3,3,5,6, > 10					6,6,6,2x > 10	2,2,3,3,3					2,2,3x3
kaikki			3,3,5,6 > 21		3,4,5,6,6	2,2,2,3, 7,8,8, 11,5x > 21	5,6,8,8	6,6,6,2x > 10	2,2,3,3,3	3,4,6,8	4x2,4x3,2x > 21	4,5,5,5	3x2,3,3,4, 3x5,6	1,1,20x2,8x3,6x4,4x5
median			5	5	5	> 21	7	6	3	5	3	5	3,5	2
elävät: kuolleet			1:4	&0:5	0:5	5:7	0:4	2:3	0:5	0:4	2:8	0:4	0:10	0:40
P-arvo														
P a:d														
arvosana														

Taulukko 56

Eri bc-100- & FL-PspA -proteiinien tuottama suoja L81905-kantaa vastaan: yhdistetyt tulokset														
Koe	CFU L81905	Hiiret	Kuolemaa edeltävät vuorokaudet/immunogeeni											
			R36A	BC100 (Rx1)	JD908 (WU2)	JS1020 (BG9379)	BC100	EF3296	EF5668	bc100 L81905	JS5010.3 (DBL5)	bc100 (DBL5)	JS3020 (DBL6A)	vertailu
E172	2,45	CBA/N			3,4,5,6,6									3,3,4,4,4
E140	3,11	CBA/N		2,5,5,6,8										2,2,2,3,3
E084	3,86	BALB				2,2,5x > 14								1,8x2
E104	·3,5	CBA/N				3,3,7, 8,8,11					3,3,3,2x > 22		3,4,5,5,6	2,4,4,4,5
E124	·3,5	CBA/N									2,2,2,2,3		2,2,2,3,5	1,2,2,2,2
E125	3,6	CBA/N					5,6,8,8			3,4,6,8		4,5,5,5		2,2,3,5,5,5
E144	4,11	CBA/N	3,3,5,6 > 10					6,6,2x > 10	2,2,3,3,3					2,2,3x3
Yhdistetyt			2,3,3,3x5,6,6,8, > 21		3,4,5,6,8	2,2,3,5,6,7,4x8,11,5x > 21		6,6,6,2x > 10	2,2,3,3,3	3,4,6,8	4x2,4x3,4,5,5,5,2x > 21		3x2,3,3,4, 3x5,6	1,1,20x28x3,6x4,4x5
Mediaani päiviä elossa			5		5	8		6	3	5	3		3,5	2
elävät:kuolleet			1:9		0:5	5:11		2:3	0:5	0:4	2:12		0:10	0:40
P-päiviä elossa			0,0005		0,0035	<0.0001		0,0002	n.s.	0,01	0,035		0,044	
P elävät:kuolleet			n.s.		n.s.	0,0001		0,01	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	
arvosana			+		+	++		++	0	+	+		+	
% elossa			10		0	31		40	0	0	14		0	0
% suojattu														
altistus L81905:lla			R36A/Rx1/D39		WU2	BG9739		EF3296	EF5668	L81905	DBL5		DBL6A	vertailut

L81905 altistus	päivät kuolemaan	mediaani päiviä kuolemaan	elossa: kuollut	*P*-äiviä kuolemaa	*P* - elossa: kuollut	Arvosana %	% elossa	% suojattu
kaikki immuunit		5	10:59	<0,0001	0,008	++	14	14
kaikki vertailut		2	0:40					

Taulukko 57

Eri FL-PspA & bc100 -proteiinien tuottama suoja DBL5-kantaa vastaan: yhdistetyt tulokset												
Koe	CFU DBL5	Hiiret	Kuolemaa edeltävät vuorokaudet/immunogeeni									
			R36A	BC100 (Rx1)	JS1020 BG9739	bc100 JS1020	EF5668	bc100 L81905	JS5010.3 DBL5	bc100 DBL5	JS3020 DBL6A	vertailu
E140	3,11	BALB/c			6x2							9x2
E084	3,86	CBA/N		4,4,5,5,5								2,2,2
E104	·3,5	Xid			3,3,6 >22, >22				7,7,15 >22, >16		2,2,4,5,5	2,4x3
E124	·3,5	Xid							2,2,2,5, >15		5x2	1,1,2,2,2
E125	3,6	CBA/N				3,3,4,5		3,3,4,4		2,2,2, >21		5x2,5
E144	4,13	Xid					2,2,3,4,4					5x2
yhteensä												
Yhdistelmän nimi			R36A/Rx1/D39		BG9739		EF5668	L81905	DBL5		DBL6A	vertailut
Yhdistetty data			4x3,2x4,3x5, >21		6x2,4x3,4,5, >21, >21		2,2,3,4,4	3,3,4,4	6x2,5,7,7,15,4x >21		7x2,4,5,5	1,1,26x2,4x3,5
Mediaani päiviä elossa			4		3		3	3,5	6		2	2
elävät:kuolleet			1:9		2:12		0:4	0:4	4:10		0:10	0:32
P-päiviä elossa			<0,0001		0,0063		0,041	0,001	0,0025		n.s.	
P elävät:kuolleet			n.s.		n.s.		n.s.	n.s.	0,0058		n.s.	
arvosana			+		+		+°	+	++		0	
% elossa			10		14		0	0	29		0	0
% suojattu			10		14		0	0	29		0	0
DBL5 altistus			R36A/Rx1/D39		BG9739		EF5668	L81905	DBL5		DBL6A	vertailut

Tämä immunointi toteutettiin solueluoidulla PspA:lla. Huomaan BALB/cJ hiiren käyttö. Huomaa myös 10^4 altistus CFU.

L81905 altistus	päivät kuolemaan	mediaani päiviä kuolemaan	elossa: kuollut	*P*-päiviä kuolemaan	*P* - elossa: kuollut	Arvosana %	% elossa	% suojattu
kaikki immuunit		3,5	7:49	0,0001	0,034	++	3,6	3,6
kaikki vertailut		2	0:33					

Taulukko 58

Eri PspA-proteiinien tuottama suoja EF6796-kantaa vastaan: yhdistetyt tulokset									
Koe	CFU WU2	Hiiret	Kuolemaa edeltävät vuorokaudet/immunogeeni						
			Rx1 BC100	JS1020 (BG9739)	L81905	JS3020 (DBL6A)	JS5010.3 FL	DBL5 bc100	vertailu
E140	3,75	CBA/N	4x>21						1,1,1
E28	?	BALB	n.v.						

Taulukko 59

Yhdistelmä suojien yhdistelmistä EF6796 vastaan						
linja	ryhmäkuvaus	viipymä ajassa kuolemaan ja/tai eloonjäämiseen			suoja kuolemaa vastaan	
		päiviä kuolemaan (median DOD)		*P*-arvot jne.	elävät:kuolleet	*P*-arvot jne.
1a	Rx1	4x>21	(>21)	0,029	4:0	0,029
1b	Rx1-vertailut	1,1,1	(1)	--	0:3	--

Taulukko 60

Eri FL-PspA & bc100 -proteiinien tuottama suoja BG7322-kantaa vastaan: yhdistetyt tulokset

Koe	CFU BG7322	Hiiret	Kuolemaa edeltävät vuorokaudet/immunogeeni										
			D39/R36A	Rx1 BD100	JD908 (WU2)	bc100 BG9739	EF3296	EF5668	bc100 L81905	JS2010.3 DBL5	bc100 DBL5	JS2020 DBL6A	vertailu
E171	2,78	CBA/N			10,15,3x>21								1,3,6,6,7
S143	3,0	CBA/N		4x>21				7,8x>10					2,2,3,4,7,7,8,8
E140 BC100	3,14	CBA/N											3,6,6,>21
E152	3,11	CBA/N				12,13,16,>21			10,12,13,>21		>21,>21, >21,>21		6,7,8,8,9,14
E140	3,57	CBA/N	18,20,3x>21				5,3x6,10			8,10,11,11,19		4,8,11,18,>21	4,5,5,6,>21
E169	3,94	CBA/N	5x>21										2,5,5,6,7
Immunogeenit			R36A/Rx1/D39		JD908	BG9739	EF3296	EF5668	L81905	DBL5		DBL6A	vert.
Yhdistelmä			18,20,12x>21		10,15,13>21	12,13,16,>21	5,3x6,10	7,8x>21	10,12,13,>21	6,10,11,11,19>21, >21,>21,>21		4,8,11,18,>21	1,3x2,3,3,4, 4,5x5,7,x6, 6,x7,4x8,9, 14,2x>21
mediaani päiviä elossa			>21		>21	14,5	6	>21	12,5	>21		11	6
elävät:kuolleet			9:0		3:2	1:3	0:5	8:1	1:3	4:5		1:3	2:32
P - päiviä elossa			<0,0001		0,0007	0,001	n.s.	<0,0001	0,0013	0,0002		0,028	
P elävät:kuolleet			<0,0001		0,004	n.s.	n.s.	<0,0001	n.s.	0,0076		n.s.	
% elossa			100		80	25	0	89	25	80		25	6
% suojattu			100		67	22	0	88	22	79		22	6
arvosana			+++		+++	+±	0	+++	+±	+++		+±	
BG7322 altistus			R36A/Rx1/D39		JD908	BG9739	EF3296	EF5668	L81905	DBL5		DBL6A	vert.

BG7322 altistus	mediaani päiviä kuolemaan	elossa: kuollut	*P*-arvo perustuen kuolemaa edeltäviin päiviin	*P*-arvo perustuen elävät:kuolleet	Arvosana	% elossa	% suojattu
kaikki immuunit	>21	30:25	<0,0001	<0,0001	+++	55	52
kaikki vertailut	6	2:32					

Esimerkki 8 - PspA-immunogeenien kyky suojata yksittäisiä altistavia kantoja vastaan

Esimerkissä 7 eräät kapselityyppiä 2, 4 ja 5 olevat kannat eivät tuottaneet täydellistä suojaa kuolemaa vastaan immunoinnin avulla. Näissä tutkimuksissa käytettiin BALB/cByJ-hiirtä yliherkän, immuunivajaan CBA/N-hiiren sijasta, jollaista käytettiin esimerkin 7 mukaisissa tutkimuksissa. Tämän BALB/cJ-hiiren tapauksessa todettiin, että immunointi PspA:lla tuotti itse asiassa suojan kuolemaa vastaan kapselityyppiä 2, 4 ja 5 olevia pneumokokkeja käytettäessä. Tämä tulos on esitetty alla olevassa taulukossa.

Taulukossa 60A esitetyistä tuloksista nähdään samoin, että 4—5 täysipituisen PspA:n seos oli yhtä tehokas tai tehokkaampi kuin immunointi vain yhdellä PspA:lla.

Taulukko 60A. Kuolemaa edeltävät vuorokaudet BALB/cByJ-hiirten tapauksessa sen jälkeen, kun ne oli immunoitu yksiarvoisella ja moniarvoisella rokotteella

Altistavat kannat					Immunogeenit			
kanta	kapselit	PspA-	pspA-	Log	Kuolemaa edeltävät vuorokaudet			
nimi	tyyppi	tyyppi	B alueen peitto	altistava annos	1 mg R36A + CFA	4-5 arvoinen seos (0,5 μg kutakin) + CFA	JY2141 + CFA	puuttuu
D39	2	25	2	4,76	3,4x>21	3,4x>21	3,4,5,11,>21	3,4,4,8
WU2	3	1	2	4,8	4x>21	4x>21	6,3x>21	3,4,2x>21
A66	3	13	?	4,7	3,3,>21,>21	2,3x>21	2,2,3,4	2,3,4,4
BG9739	4	26	1	4,07-4,4	7,8x>21	3,8x>21	1,5,6,6,9,4x>21	3,3,3,4,6,7,7,2x>21
L81905	4	23	1	6,90-6,96	2,2,2,2,5,5,4x>21	2,6,8,9,6x>21	1,1,1,1,2,3,4,5, 2x>21	1,4x2,3x3,4,>21

EF5668	4	12	4	6,10-6,93	3,3,4,7x>21	3x3,6x>21	4x3,4,4,6,6,>21	3,5x4,6,>21
DBL5	4	33	2	3,30	7,14,3x>21	3,5,5,2x>21	2,2,2,4,6	4,5,5,6,9
DBL6A	6A	19	1	4,34	6,9,10,11,>21	10,11,12,13,>21	3,11,11,13,16	8,9,11,21,>21
BG7322	6B	21	?	3,9	8,8,3x>21	5x>21	6,6,7,8,10	2,5,6,8,8

Huom. sellaiset tulokset kuten 8x > 21 tarkoittavat sitä, että 8 hiirtä pysyi kauemmin kuin 21 vuorokautta elossa.

Huom. JY2141 on saatu kannasta, josta puuttuu PspA. Puuttuu = ei immunointia.

Huom. Hiiret immunoitiin kaksi kertaa PspA:lla kahden viikon välein ja ne altistettiin laskimon sisäisesti 2 viikkoa viimeisen immunoinnin jälkeen. Ensimmäinen immunointi annettiin ihon alaisesti täydellisessä Freund:in apuaineessa (CFA), toinen immunointi annettiin vatsaontelon sisäisesti suolaliuoksessa.

4-arvoinen rokoteseos R36A, BG9739, EF5668 ja DBL5 -- kaikki E180

4-arvoinen rokoteseos R36A, BG9739, DBL5, EF3296, D39 ja DBL6A

5-arvoinen rokoteseos R36A, BG9739, DBL5, EF3296, EF5668

Esimerkki 9 - Pneumokokkikannoissa MC25-28 läsnä olevien PspA-epitooppien tunnusomaiset piirteet

Tutkitut kannat olivat peräisin 13:n 6B-kapseliserotyyppiä olevan tunnistetun kannan ryhmästä, jotka kannat ovat moninkertaisesti vastustuskykyisen kloonin jäseniä, ja jotka ovat vastustuskykyisiä penisilliinille, kloramfenikolille, tetrasykliinille, ja joista eräät ovat tulleet vastustuskykyisiksi erytromysiinille. Seuraavissa tutkimuksissa kuvatut pneumokokkieristeet (MC25-28) ovat tämän 6B-kloonin jäseniä. Vaikka aikaisemmin ollaankin luultu, että tämän kloonin jäsenet voidaan rajata maantieteellisesti Espanjaan (toisin kuin laajalle levinnyt, moninkertaisesti vastustuskykyinen espanjalainen 23F-serotyypin klooni), niin kuitenkin tämän kloonin jäsenet on todettu suurentuneen penisilliinin vastustuskyvyn aiheuttajiksi Islannissa (Soares, S., et al., J. Infect. Dis. 1993; 168; 158—163).

Seuraavien tekniikoiden avulla määritettiin erilaisten PspA-epitooppien sijainti:

Bakteerisoluviljely

Bakteereita kasvatettiin Todd-Hewitt-alustalla, joka sisälsi 0,5 % hiivauutetta, tai veriagarmaljoilla yön yli 37 °C:ssa kynttilämaljassa. Kapseliserotyyppi varmistettiin soluagglutinaatiolla käyttäen tanskalaisia antiseerumeita (Statens Seruminstitut, Kööpenhamina, Tanska). Näiden eristeiden alityypiksi määritettiin 6B Quellungreaktiolla, jossa käytettiin kaniinin antiseerumeita 6A- tai 6B-kapseliantigeenia vastaan.

Bakteerihajotteet

Soluhajotteet valmistettiin inkuboimalla bakteerisolukasaumaa liuoksessa, joka sisälsi 0,1 % natriumdeoksikolaattia, 0,01 % natriumdodekyylisulfaattia (SDS) ja 0,15 M natriumsitraattia, minkä jälkeen hajote laimennettiin 0,5M Tris-hydrokloridilla (pH 6,8). Näiden hajotteiden kokonaispneumokokkiproteiini kvantitoitiin bikinkoniinihap-

poon perustuvalla menetelmällä (BCA Protein Assay Reagent; Pierce Chemical Company, Rockford, IL).

PspA:n serotyypin määritys

Pneumokokkisolujen hajotteet käsiteltiin SDS-PAGE-menetelmällä, ne siirrettiin nitroselluloosakalvoille ja kehitettiin Western-täplinä käyttäen seitsemän, PspA:ta vastaan kehitetyn monoklonaalisen vasta-aineen joukkoa. PspA-serotyyppien määrittäminen perustuu siihen erityiseen MAb-yhdistelmään, joiden MAb-vasta-aineiden kanssa kukin PspA oli reaktiivinen.

Pesäkkeiden immuunitäplät

Kymmenen ml:n putkelliseen Todd-Hewitt-alustaa, joka sisälsi 0,5 % hiivauutetta, siirrostettiin yön yli veriagarmaljalla kasvanutta MC25-viljelmää. Eristeen annettiin kasvaa 10^7 solua/ml olevaan pitoisuuteen määritettynä 0,07 olevana OD-arvona aallonpituudella 590 nm. MC25:sta tehtiin laimennussarja ja laimennuksia levitettiin veriagarmaljoille siten, että maljaa kohden saatiin arviolta 100 solua. Maljojen annettiin kasvaa yön yli kynttilämaljassa ja sitten valittiin yksi veriagarmalja, jolla oli hyvin määriteltyjä pesäkkeitä. Neljä nitroselluloosakalvoa laitettiin peräkkäin maljalle. Kutakin kalvoa painettiin kevyesti ja kalvo jätettiin paikoilleen 5 minuutiksi. Jotta voitaisiin selvittää kahden Western-täplistä ilmaistun proteiinin välisen vaihe-eron mahdollisuus, maljalta otettiin vain yksi pesäke, se suspendoitiin uudestaan Ringer:in liuokseen ja levitettiin veriagarmaljalle. Kalvot kehitettiin Western-täplinä PspA:n serotyypin määrittämiseksi käytettyjen menetelmien mukaisesti.

Kun kantoja MC25-28 tutkittiin seitsemällä, eri PspA-epitooppien suhteen spesifisellä monoklonaalisella vasta-aineella, kaikki neljä tuottivat samat reaktiivisuuskuviot (kuvio 14). MAb:t XiR278 ja 2A4 ilmaisivat jokaisessa eristeessä PspA-molekyylin, jonka näennäinen molekyylipaino oli 190 kDa. PspA:n serotyypin määrittämiseksi käytetyn järjestelmän mukaisesti tämä 190 kDa:n molekyyli todettiin tyyppiä 6 olevaksi PspA:ksi, koska se oli reaktiivinen vasta-aineiden XiR278 ja 2A4 kanssa,

ei kuitenkaan muiden viiden, tässä tyypnmääritysjärjestelmässä käytetyn monoklonaalisen vasta-aineen kanssa. Kukin eriste tuotti myös toisen PspA-molekyylin, jonka näennäinen molekyylipaino oli 82 kDa. Tämä kustakin eristeestä saatu 82 kDa:n PspA voitiin ilmaista vain vasta-aineella 7D2, ja se todettiin tyypiksi 34. Monoklonaalisilla vasta-aineilla Xi126, Xi64, 1A4 tai SR4Wr ei todettu lainkaan reaktiivisuutta. Pesäkkeiden immuunitäplistä saadut tulokset osoittivat, että molemmat PspA:t olivat läsnä samanaikaisesti näissä eristeissä in vitro-kasvatusolosuhteissa. Kaikki maljalla olevat pesäkkeet sekä kaikki vain yhdestä pesäkkeestä saadut jälkeläiset reagoivat monoklonaalisten vasta-aineiden XiR278, 2A4 ja 7D2 kanssa.

Esimerkki 10 - Pneumokokkikannoista MC25-28 eristetyn kromosomaalisen DNA:n Southern blot -analyysi

Pneumokokkien kromosomaalinen DNA eristettiin Youderian:in menetelmällä (Sheffield, J.S., et al., Biotechniques, 1992; 12: 836—839). Lyhyesti, 500 ml:n THY-viljelmän tai 1 % koliinia sisältävän THY-viljelmän tapauksessa soluja sentrifugoitiin nopeudella 8000 kierr./min GSA-roottorilla 30 minuuttia 4 °C:ssa. Supernatantti dekantoitiin ja solut pestiin 1—2 tilavuudella steriiliä vettä mahdollisesti käytetyn koliinin poistamiseksi. Tämä vaihe oli välttämätön vain, mikäli natriumdeoksikolaattia käytettiin. Pestyjä soluja sentrifugoitiin kahdesti nopeudella 8000 kierr./min GSA-roottorilla 10 minuuttia. Solut suspendoitiin uudestaan 3,5 ml:aan TE-puskuria, joka sisälsi 1 % SDS:ia tai 1 % natriumdeoksikolaattia, ja inkuboitiin 37 °C:ssa 15 minuuttia, mikäli natriumdeoksikolaattia käytettiin. SDS:ia käytettäessä inkubointi 37 °C:ssa ei ollut välttämätöntä. Soluja inkuboitiin 65 °C:ssa 15 minuuttia ja 1/5-tilavuus 5,0 M kaliumasetaattia lisättiin ja solususpensiota inkuboitiin 30 minuuttia 65 °C:ssa.

Solut laitettiin jäihin 60 minuutiksi ja niitä sentrifugoitiin nopeudella 12 000 kierr./min SS-34-roottorissa 10 minuuttia. Supernatantti siirrettiin puhtaaseen sentrifugiputkeen ja siihen lisättiin 2 tilavuutta kylmää 95 % etanolia. Sekoittamisen jälkeen DNA kelottiin lasisen Pasteur-pipetin päälle ja kuivattiin ilmassa. DNA suspendoitiin uudestaan 4 ml:aan TE-puskuria ja 4,0 g kesiumkloridia lisättiin. Liuos

jaettiin kahdeksi osaksi ultrasentrifugiputkiin ja putket täytettiin niiden suurimpaan vetoisuuteen käyttäen 1,0 g/ml kesiumkloridia TE:ssa. Ennen putkien sulkemista niihin lisättiin 300 ml liuosta, joka sisälsi 10 μg/ml etidiumbromidia.

Liuosta sentrifugoitiin nopeudella 45 000 kierr./min yön yli tai 6 tuntia nopeudella 55 000 kierr./min. Kromosomivyöhyke uutettiin käyttäen gradienttia, vähintään 6 kertaa kulloinkin 1 tilavuudella suolalla kyllästettyä isopropanolia. Vesifaasi uutettiin lisämällä 2 tilavuutta 95 % etanolia. DNA erottui liuoksesta välittömästi ja se kelottiin Pasteur-pipetin päälle. Eristetty DNA huuhdottiin upottamalla kelottu DNA 5 ml:aan 70 % etanolia. DNA kuivattiin ilmassa ja se suspendoitiin uudestaan toivottuun tilavuuteen, esimerkiksi 500 μl:aan TE-liuosta.

Solut otettiin talteen, pestiin, hajotettiin ja pilkottiin olosuhteissa, joissa oli läsnä 0,5 % (p/til) SDS ja 100 μg/ml proteinaasi K:ta, 37 °C:ssa 1 tunnin ajan. Soluseinämäjäte, proteiinit ja polysakkaridit kompleksoitiin 1 % heksadekyyli-trimetyyli-ammoniumbromidilla (CTAB) ja 0,7M natriumkloridilla 65 °C:ssa 20 minuuttia, ja sitten ne uutettiin kloroformin ja isoamyylialkoholin seoksella. DNA saostettiin 0,6 tilavuudella isopropanolia, pestiin ja suspendoitiin uudestaan liuokseen, joka sisälsi 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0. DNA-pitoisuus määritettiin spektrofotometrisellä analyysillä, aallonpituudella 260 nm (Meade, H.M. et al., J. Bacteriol 1982; 149: 114—122; Silhavy, T.J. et al., Experiments with Gene Fusion, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1984; sekä Murray, M.G., et al., Nucleic Acids Res., 1980; 8 4321—4325).

<u>Koettimen valmistus</u>

5'- ja 3'-oligonukleotidialukkeita, jotka olivat homologiset Rx1 *pspA*:n nukleotidien -26 sekä 1967-1990 kanssa (vastaavasti LSM13 ja LSM2), käytettiin täysipituisen *pspA*:n monistamiseksi ja koettimen LSM*pspA*13/2 muodostamiseksi Rx1:n perimän DNA:sta. Nukleotidien 161—187 ja nukleotidien 1093—1117 kanssa homologisia 5'- ja 3'-oligonukleotidialukkeita (vastaavasti LSM12 ja LSM6) käytettiin vaihtelevan alfa-kierteisen alueen monistamiseksi, jolloin saatiin koetin LSM*pspA*12/6. PCR-

tekniikalla tuotettu DNA puhdistettiin Gene Clean -menetelmällä (Bio101 Inc., Vista, CA) ja leimattiin satunnaisalukkeella digoksigeniini-11-dUTP käyttäen reagenssipakkausta Genius 1 Nonradioactive DNA Labeling and Detecting Kit, valmistajan ohjeiden mukaisesti (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN).

DNA-elektroforeesi

Southern blot -analyysia varten noin 10 μg kromosomaalista DNA:ta pilkottiin täydellisesti vain yhdellä restriktioendonukleaasilla (HindIII, Kpn 1, EcoR1, Dra1 tai Pst1), ja käsiteltiin sitten 16—48 tuntia elektroforeesilla, käyttäen 0,7 % agaroosigeeliä ja 35 voltin jännitettä. PCR-analyysia varten 5 μg tuotetta inkuboitiin yhdessä vain yhden restriktioendonukleaasin kanssa (Bcl1, BamH1, Pst1, Sac1, EcoR1, Sma1 ja Kpn1), ja käsiteltiin sitten 2—3 tunnin ajan elektroforeesilla käyttäen 1,3 % agaroosigeeliä ja 90 voltin jännitettä. Kummassakin tapauksessa käytettiin 1 kb:n DNA-tikkaita molekyylipainon merkkiaineena (BRL, Gaitherburg, MD) ja geelejä värjättiin etidiumbromidilla 10 minuuttia ja ne valokuvattiin yhdessä viivaimen kanssa.

Southern blot -hybridisaatio

Geelillä olevasta DNA:sta poistettiin puriinia 0,25N HCl-liuoksessa 10 minuuttia, se denaturoitiin 0,5M NaOH-liuoksessa ja 1,5M NaCl-liuoksessa 30 minuuttia ja neutraloitiin 30 minuuttia liuoksessa, joka sisälsi 0,5M Tris-HCl (pH 7,2), 1,5M NaCl ja 1 mM dinatrium-EDTA. DNA siirrettiin nailonkalvolle (Micron Separations Inc., MA) käyttäen täplien muodostamiseen POSIBLOT Pressure Blotter -välinettä (Stratagene, La Jolla, CA) 45 minuuttia ja kiinnitettiin UV-säteilyllä. Näitä kalvoja esihybridisoitiin 3 tuntia 42 °C:ssa liuoksessa, jonka koostumus oli 50 % formamidia, 5x SSC, 5x Denhardt:in liuos, 25 mM natriumfosfaatti (pH 6,5), 0,5 % SDS, 3 % (p/til) dekstraanisulfaattia ja 500 μg/ml denaturoitua lohen sperman DNA:ta. Sitten kalvoja hybridisoitiin 42 °C:ssa 18 tuntia liuoksessa, joka sisälsi 45 % formamidia, 5x SSC, 1x Denhardt:in liuosta, 20 mM natriumfosfaattia (pH 6,5), 0,5 % SDS, 3 % (p/til) dekstraanisulfaattia, 250 μg/ml denaturoitua, leikattua lohen sperman DNA:ta ja noin 20 ng lämmön avulla denaturoitua, diogoksigeenilla

leimattua DNA-koetinta. Hybridisaation jälkeen kalvot pestiin kahdesti, kulloinkin 3 minuuttia huoneen lämpötilassa liuoksella, jonka koostumus oli 0,1 % SDS ja 2x SSC. Kalvot huuhdottiin kahdesti lopulliseen ehdottomuuteen liuoksella, joka sisälsi 0,1 % SDS, 0,3x SSC, 65 °C:ssa 15 minuuttia. Tällä tavalla menettelemällä päästään yli 95 % olevaan ehdottomuuteen (stringency). Kalvot kehitettiin käyttäen valmista reagenssipakkausta Genius 1 Nonradioactive DNA Labeling and Detecting Kit, valmistajan ohjeiden mukaisesti (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Jotta kalvoilla voisi toteuttaa muita hybridisointeja muiden koettimien kanssa, niitä huuhdottiin 30 minuuttia 40 °C:ssa 0,2 N NaOH/0,1 % SDS-liuoksessa, minkä jälkeen ne huuhdottiin kahdesti 2x SSC-liuoksessa.

PCR

Tässä kokeessa käytettiin 5'- ja 3'-alukkeita, jotka olivat homologiset PspA:n N- ja C-päätteen päitä koodaavan DNA:n kanssa (vastaavasti LSM13 ja LSM2). Reaktiot toteutettiin 50 μl:n tilavuudessa, joka sisälsi 0,2 mM kutakin dNTP:tä sekä 1 μl kumpaakin aluketta 50 mM olevana käyttöpitoisuutena. Yhdistettä $MgCl_2$ käytettiin 1,75 mM olevana optimaalisena pitoisuutena yhdessä Taq DNA-polymeraasin 0,25 yksikön kanssa. Jokaiseen reaktioputkeen lisättiin 10-30 ng perimän DNA:ta. Monistusreaktiot toteutettiin Thermal Cycler -laitteessa (M.J. Research, Inc.) käyttäen seuraavaa kolmivaiheista ohjelmaa. Vaiheessa 1 käytettiin 94 °C olevaa denaturoivaa lämpötilaa 2 minuutin ajan. Vaihe 2 koostui 9 täydellisestä syklistä, jossa syklissä käytettiin 94 °C olevaa denaturoivaa lämpötilaa 1 minuutin ajan, 50 °C olevaa kiinnityslämpötilaa 2 minuutin ajan ja 72 °C olevaa jatkamislämpötilaa 3 minuutin ajan. Vaihe 3 toistettiin 19 kertaa, käyttäen 94 °C olevaa denaturoivaa lämpötilaa 1 minuutin ajan, 60 °C olevaa kiinnityslämpötilaa 2 minuutin ajan ja 72 °C olevaa jatkamislämpötilaa 3 minuutin ajan. Viimeisen syklin päätyttyä näytteitä pidettiin 72 °C:ssa 5 minuuttia jatkamisen viemiseksi täydellisesti päätökseen.

Vyöhykkeen koon arvioiminen

Kappaleiden koot molekyylipainostandardien kuviossa ja Southern blot -hybridisaatiokuviossa laskettiin siirtymisetäisyyksistä. Standardimolekyylikoot sovitettiin logaritmiseen regressiomalliin käyttäen Cricket Graph -käyrää (Cricket Software, Malvern, PA). Ilmaistujen vyöhykkeiden molekyylipainot arvioitiin sijoittamalla Cricket Graph -käyrän avulla saatu logaritminen viivayhtälö Microsoft:in Excel-ohjelmaan (Microsoft Corporation, Redmond, WA) molekyylipainojen laskemiseksi Southern blot -määrityksessä saatujen siirtymisetäisyyksien perusteella.

Koska useimmat kannat sisältävät *pspA*-geenin ja *pspC*-geenin, niin odotettavaa oli, että jos läsnä oli ylimääräinen geeni, niin tällöin eristeissä MC25-28 voitiin havaita vähintään kolme *pspA*-homologista geenialuetta. Kantojen MC25-28 HindIII-pilkkeissä kussakin kannassa todettiin 7,7 ja 3,6 kb:n vyöhykkeet, kun käytetty koetin oli LSM*pspA*13/2 (kuvio 15A ja 15C). Vertailuna, kun Rx1 DNA pilkottiin entsyymillä HindIII ja hybridisoitiin muodosteen LSM*pspA*13/2 kanssa, niin homologiset sekvenssit ilmaistiin 9,1 ja 4,2 kb:n kappaleista, mikä oli odotettavaa PspA:lla toteutettujen aikaisempien tutkimusten perusteella (Kuvio 15A). Tulokset, jotka vastasivat kahta *pspA*-homologista geeniä kannoissa MC25-28, saatiin kahdella *pspA*-homologisella geenillä kannoissa MC25-28, jotka oli pilkottu käyttäen vielä neljää muuta entsyymiä (taulukko 61).

Taulukko 61. Kromosomaaliset RFLP-monimuotoisuudet koettimella LSM*pspA*13/2 eristeiden MC25-28 ja Rx1 tapauksessa

Restriktio-entsyymi	Tutkitut kannat					Restriktiokappaleet (koot kiloemäksinä)	
	MC25	MC26	MC27	MC28	RX1	MC25-28	Rx1
Hind III	+	+	+	+	+	7,7, 3,6	9,1, 4,2
Kpn I	+	+	+	+	+	7,7, 10,6	10,6, 9,8
EcoR I	+				+	8,4, 7,6	7,8, 6,6
Dra I	+				+	2,1, 1,1	1,9, 0,9
Pst I	+				+	>14, 6,1	10,0, 4,0

Nämä kaikki neljä tutkittua eristettä ovat vain yhden, Espanjasta eristetyn, kapselityyppiä 6B olevan pneumokokkikloonin jäseniä. Nämä neljä eristettä ovat ensimmäiset kannat, joissa on todettu kaksi PspA:ta, eli PspA ja PspC, perustuen siihen havaintoon, että eri molekyylipainoja vastaavat vyöhykkeet voitiin ilmaista PspA:ta vastaan vaikuttavilla erilaisilla monoklonaalisilla vasta-aineilla. Mutaatio- ja immunokemialliset tutkimukset ovat osoittaneet, että kaikki Rx1-kannasta peräisin olevat erikokoiset PspA-vyöhykkeet ovat muodostuneet yhdestä geenistä, joka kykenee koodaamaan 69 kDa:n proteiinia, mikä tukee sitä väitettä, että kaksi PspA:ta eli PspA ja PspC on havaittu.

Ollaan havaittu, että *pspA*:n 5'-puolen (johon on koodautunut proteiinin alfa-kierteinen puolikas) koetin sitoo useimpien kantojen *pspC*-sekvenssin vain noin 90 % olevalla ehdottomuudella. MC25-28-kantojen kromosomipilkkeiden tapauksessa todettiin, että Rx1 5'-koetin LSM*pspA*12/6 (kuvio 15D) sitoi kaksi *pspA*-homologita vyöhykettä tätä suuremmalla ehdottomuudella. Tämä sama koetin sitoi suuremmalla ehdottomuudella vain Rx1:stä peräisin olevan, *pspA*:n sisältävän kappaleen (kuvio 15B).

PspA-geenin tunnusomaisia piirteitä selvitettiin edelleen kustakin kannasta saadun, PCR-monistetun *pspA*:n RFLP-analyysilla. Koska aikaisemmat tutkimukset osoittivat, että yksittäisistä kannoista saatiin vain yksi tuote, ja koska monistaminen tapahtui tunnettuun *pspA*-sekvenssiin perustuvilla alukkeilla, niin oletettiin, että kustakin kannasta monistunut tuote edusti *pspA*-geeniä eikä *pspC*-geeniä. Kun MC25-28-kantoja käsiteltiin tällä menetelmällä, niin tällöin jokaisesta neljästä kannasta saatiin 2,1 kb:n suuruinen monistunut *pspA*-tuote. Kun tämä kappale pilkottiin entsyymillä Hha I, niin se tuotti 1,1, 0,46, 0,21 ja 0,19 kb:n suuruiset vyöhykkeet näistä neljästä eristeestä kunkin tapauksessa. Yksi eriste eli MC25 analysoitiin vielä kahdeksalla muulla entsyymillä. Kutakin restriktioentsyymiä käyttäen saatujen kappaleiden summa vastasi aina suurin piirtein koko *pspA*:n kokoa. Nämä tulokset viittaavat siihen, että 2,1 kb:n monistunut DNA edustaa vain yhden *pspA*-geenin monistunutta tuotetta. Rx1 tuotti 2,0 kb:n monistuneen tuotteen sekä viisi kappaletta, joiden koot

olivat 0,76, 0,468, 0,390, 0,349 ja 0,120 kb, kun se pilkottiin entsyymillä Hha I, sen tunnetun *pspA*-sekvenssin perusteella odotetulla tavalla.

Useita mahdollisia selityksiä on sille, että PspA:ta ja PspC:ta on havaittu näissä kannoissa, ei kuitenkaan muissa kannoissa. Kaikki eristeet saattavat tuottaa PspA:ta ja PspC:ta viljelmässä, mutta monoklonaaliset vasta-aineet tunnistavat yleensä vain PspA:n (tässä eristeessä on saattanut tapahtua uudelleenyhdistymistä *pspC* DNA:n ja *pspC*-geenialueen välillä, jolloin tämä geenialue tuottaa PspA:ta tunnistavan monoklonaalisen vasta-aineen ilmaiseman tuotteen). Kaikki eristeet saattavat käsittää PspA:ta ja PspC:ta, mutta näistä proteiineista toinen ei yleensä ilmenny in vitro-kasvuolosuhteissa. *PspC*-geenialue on normaalisti toimintakyvytön näennäisgeenisekvenssi, joka jostakin selittämättömästä syystä on muuttunut toimintakykyiseksi näissä eristeissä. Näiden eristeiden tuottamien pesäkkeiden immuunitäplistä saadut tulokset eivät kyenneet osoittamaan havaittavaa in vitro-vaihesiirtymää tyyppiä 6 (XIR278 ja 2A4) olevan PspA-proteiinin eikä tyyppiä 34 (7D2) olevan PspA-proteiinin välillä. Tämä vahvistaa toista selitystä ja viittaa siihen, että tämä toinen PspA näissä eristeissä johtuu siitä, ettei *pspC*-geeni ole kytkeytynyt pois päältä in vitro-kasvuolosuhteiden ajaksi.

Oletettavaa on, että näissä neljässä kannassa *pspC* DNA-sekvenssi saa aikaan toisen PspA-proteiinin. Koetin, joka käsitti PspA-proteiinin alfa-kierteistä puolikasta koodaavan alueen, tunnisti suurella ehdottomuudella kantojen MC25-28 molemmat *pspA*-homologiset sekvenssit, muttei Rx1:n *pspC*-sekvenssiä. Tämä havainto osoitti, että kantojen MC25-28 *pspC*-sekvenssi muistuttaa enemmän Rx1:n *pspA*-sekvenssiä kuin Rx1:n *pspC*-sekvenssiä. Mikäli näiden kantojen *pspC*-sekvenssi muistuttaa enemmän *pspA*-sekvenssiä kuin useimpia *pspC*-sekvenssejä, niin tämä saattaa selittää sen, miksi monoklonaaliset vasta-aineet eivät yleensä kykene tunnistamaan *pspC*-geenien tuotteita.

Esimerkki 11 - *S. pneumoniae* -eliön *pspA*- ja *pspC*-sekvensseissä läsnä olevien säilyneiden ja vaihtelevien alueiden tunnistaminen

Tässä tutkimuksessa käytetyt *S. pneumoniae* -kannat on lueteltu taulukossa 62. Nämä kannat ovat ihmisestä saatuja kliinisiä eristeitä, jotka edustavat 12 kapselityyppiä ja 9 PspA-serotyyppiä. Kaikkia kantoja kasvatettiin 37 °C:ssa, 100 ml:ssa Todd-Hewitt -elatusalustaa, jota oli täydennetty 0,5 %:lla hiivauutetta, noin 5 x 10^8 solua/ml olevaksi pitoisuudeksi. Sen jälkeen, kun solut oli otettu talteen sentrifugoimalla (2900 x g, 10 min), DNA eristettiin ja sitä säilytettiin 4 °C:ssa TE-liuoksessa (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0).

Taulukko 62. Käytetyt *Streptococcus pneumoniae* -kannat

Kanta	Asiaan liittyvä fenotyyppi	Viite
WU2	Kapselityyppi 3, PspA-tyyppi 1	Briles et al., 1981
D39	Kapselityyppi 2, PspA-tyyppi 25	Avery et al., 1944
R36A	D39:n kapseloitumaton johdannainen, pspa-tyyppi 25	Avery et al., 1944
Rx1	R36A:n johdannainen, PspA-tyyppi 25	Shoemaker and Guild, 1974
DBL5	Kapselityyppi 5, PspA-tyyppi 33	Yother et al., 1986
DBL6A	Kapselityyppi 6A, PspA-tyyppi 19	Yother et al., 1986
A66	Kapselityyppi, 3, PspA-tyyppi 13	Avery et al., 1944
AC94	Kapselityyppi 9L, PspA-tyyppi 0	Waltman et al., 1992
AC17	Kapselityyppi 9L, PspA-tyyppi 0	Waltman et al., 1992
AC40	Kapselityyppi 9L, PspA-tyyppi 0	Waltman et al., 1992
AC107	Kapselityyppi 9V, PspA-tyyppi 0	Waltman et al., 1992
AC100	Kapselityyppi 9V, PspA-tyyppi 0	Waltman et al., 1992
AC140	Kapselityyppi 9N, PspA-tyyppi 18	Waltman et al., 1992
D109-1B	Kapselityyppi 23, PspA-tyyppi 12	McDaniel et al., 1992
BG9709	Kapselityyppi 9, PspA-tyyppi 0	McDaniel et al., 1992
L81905	Kapselityyppi 4, PspA-tyyppi 25	McDaniel et al., 1992
L82233	Kapselityyppi 14, PspA-tyyppi 0	McDaniel et al., 1992
L82006	Kapselityyppi 1, PspA-tyyppi 0	McDaniel et al., 1992

Noin 5 μg kromosomaalista DNA:ta pilkottiin entsyymillä HindIII valmistajan ohjeiden mukaisesti (Promega, Inc., Madison, WI). Pilkottua DNA:ta käsiteltiin yön yli elektroforeettisesti käyttäen 35 mV:n jännitettä 0,8 %:n agaroosigeeleillä, minkä

jälkeen Nytran®kalvoille (Schleicher & Schuell, Keene, NH) muodostettiin tyhjön avulla täpliä.

Käytetyt oligonukleotidit perustuivat aikaisemmin määritettyyn Rx1 *pspA*-sekvenssiin. Niiden asema ja suuntautuminen Rx1 *pspA*:n rakennedomeenien suhteen on esitetty kuviossa 17. Sekä oligonukleotidien leimaaminen että koetin-kohde-hydridien ilmaiseminen toteutettiin Genius System®-järjestelmällä valmistajan ohjeiden mukaisesti (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN). Kaikki hybridisoinnit toteutettiin 18 tunnin ajan 42 °C:ssa ilman formamidia. Olettaen, että 1 % vastaava emäsparien yhteensopimattomuus johtaa siihen, että T_m-arvo laskee 1 °C:n verran, mielivaltaiset käsitteet "suuri" ja "pieni" ehdottomuus määriteltiin hybridisaation jälkeisten pesujen suolapitoisuudella ja lämpötilalla. Koetin- ja kohdesekvenssien välinen homologia saatiin vakiintuneilla menetelmillä käyttäen laskettua T_m-arvoa. Suuri ehdottomuus on määritelty 90-prosenttiseksi tai suuremmaksi homologiaksi ja pieni ehdottomuus on 85-prosenttinen tai pienempi sekvenssien homologia.

Toteutetut PCR-alukkeet, joita käytettiin myös oligonukleotidikoettimina Southern blotting -menetelmässä ja hybridisoinneissa, perustuivat pneumokokkikannasta Rx1 peräisin olevan *pspA*:n sekvenssiin. Nämä oligonukleotidit syntetisoitiin Oligos, Etc.-menetelmällä (Wilson, OR) ja ne on lueteltu taulukossa 63.

Taulukko 63. Oligonukleotidisekvenssit

Aluke	5' → 3'
LSM11	CCGGATCCAGCTCCTGCACCAAAC
LSM2	GCGCGTCGACGCTTAAACCCATTCACCATTGG
LSM3	CCGGATCCTGAGCCAGAGCAGTTGGCTG
LSM4	CCGGATCCGCTCAAAGAGATTGATGAGTCTG
LSM5	GCGGATCCCGTAGCCAGTCAGTCTAAAGCTG
LSM6	CTGAGTCGACTGGAGTTTCTGGAGC
LSM7	CCGGATCCAGCTCCAGCTCCAGAAACTCCAG
LSM9	GTTTTTGGTGCAGGAGCTGG
LSM10	GCTATGGCTACAGGTTG
LSM12	CCGGATCCAGCGTGCCTATCTTAGGGGCTGGT
LSM112	GCGGATCCTTGACCAATARRRACGGAGGAGGC

PCR toteutettiin yhtiön MJ Research, Inc. ohjelmoitavalla Thermal Cycler-laitteella (Watertown, MA), käyttäen mallineena noin 10 ng pneumokokin perimän DNA:ta yhdessä tiettyjen 5'- ja 3'-alukeparien kanssa. Näytteen lopullinen tilavuus asetettiin arvoon 50 μl, ja se sisälsi lopullisena pitoisuutena 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM $MgCl_2$, 0,01 % gelatiinia, 0,5 μM kutakin aluketta, 200 μM kutakin deoksinukleosidi-trifosfaattia ja 2,5 U Taq DNA-polymeraasia. Näytteitä denaturoitiin 94 °C:ssa 2 minuuttia ja ne alistettiin 10 jaksoon, joissa niitä pidettiin 1 min 94 °C:ssa, 2 min 50 °C:ssa ja 3 min 72 °C:ssa, minkä jälkeen toteutettiin 20 jaksoa, joissa näytteitä pidettiin: 1 min 94 °C:ssa, 2 min 60 °C:ssa ja 3 min 72 °C:ssa. Yhteensä 30 jakson jälkeen näytteitä pidettiin 72 °C:ssa vielä 5 minuuttia ennen jäähdyttämistä 4 °C:n lämpötilaan. Monistuneet tuotteet analysoitiin sitten elektroforeettisesti agaroosigeelillä.

Oligonukleotideja käytettiin koettimina 18 *S. pneumoniae* -kannasta peräisin olevan DNA:n HindIII-pilkkeissä pientä ja suurta ehdottomuutta vastaavissa olosuhteissa. Kukin kanta seulottiin myös käyttäen täysipituista *pspA*-koetinta. Taulukkoon 64 on koottu tulokset, jotka on saatu kullakin kannalla suurta ehdottomuutta vastaavissa olosuhteissa. Kanta Rx1 on kliinisen eristeen D39 laboratoriojohdannainen ja näin

ollen nämä molemmat kannat tuottivat samanlaiset hybridisointikuviot ja ne on esitetty taulukossa 64 samassa sarakkeessa.

Taulukko 64. Yhteenveto oligonukleotidien ja kromosomaalisten HindIII-restriktiokappaleiden välisestä hybridisaatiosta

	Kannat																
Probe	Rx1/ D39	WU2	DBL5	DBL6A	A66	AC94	AC17	AC40	AC107	AC100	AC140	AC109	BG9709	BG58C	L81905	L82233	L82006
FL-Rx1[a]	4,0, 9,1[b]	3,8	3,7, 5,8	3,0,3,4	3,6, 4,3	3,6,6,3	3,6, 6,3	3,2, 3,6	3,2,3,6	4,0,8,0	3,0,4,0	3,3,4,7	3,3,4,7	1,4,3, 2,3,6	3,6,5,2	8,2,3,7	4,3,6,4
LSM1 2	4,0,9,1	3,8	3,7, 5,8	3,0,3,4	4,3	c	3,6, 6,3	3,2, 3,6	-	4,0,8,0	4,0	3,3,4,7	2,2,9,6	1,4,3, 2,3,6	3,6	1,3,3,7	-
LSM5	4,0		-	-	-	3,6,6,3	-	-	-	-	-	-	2,2,9,6	3,6	1,2,2, 3,3,6	-	-
LSM3	4,0	3,8	-	-	-	6,3	-	-	-	-	-	-	2,2	3,6	3,6	-	-
LSM4	4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,2	3,6	3,6	3,7	-
LSM7	4,0,9,1	3,8	3,7	3,0,3,4	3,6	-	-	3,2, 3,6	-	-	3,0,4,0	3,3,4,7	2,2,9,6	3,6	3,6,2,3	3,7	-
LSM1 1	4,0,9,1	3,8	3,7, 5,8	3,4	-	6,3	-	3,2	3,6	4,0	4,0	-	2,2	-	5,2	-	-
LSM1 0	4,0,9,1	3,8	3,7	3,4	3,6, 4,3	-	3,6, 6,3	3,2	3,6,3,3	4,0	4,0	3,3,4,7	2,2,9,6	3,6,3,2	3,6,6,2	1,3,3,7	4,3,6,4
LSM2	4,0	-	3,7	-	-	3,6	3,6	-	3,6,3,3	4,0	3,0,4,0	4,7	-	-	-	-	4,3

[a]Kannan Rx1 täysipituinen *pspA*
[b]numerot ovat koko kiloemäspareissa
[c]Hybridisoitumista ei todettu vastaavan koettimen kanssa

Ainoa kanta, jolla ei ollut useampia kuin yksi *pspA*-homologinen HindIII-kappale, oli WU2, mikä on osoitettu aikaisemmin käyttäen täysipituista *pspA*-koetinta. Myös suurella ehdottomuudella kuusi kahdeksasta koettimesta ilmaisi useamman kuin yhden kappaleen vähintään yhdessä näistä 18 kannasta (taulukko 64). LSM7, -10 ja -12 hybridisoituivat kahden kappaleen kanssa useammassa kuin puolessa näistä kannoista, ja oligonukleotidikoettimien ilmaisemat kappaleet olivat samankokoisia kuin täysipituisen *pspA*-koettimen ilmaisemat kappaleet. Lisäksi Rx1 *pspA*:n 3'-alueesta sekä 5'-alueesta saadut koettimet ilmaisivat usein samat kappaleparit. Nämä tulokset viittaavat siihen, että eri eristeistä peräisin olevat HindIII-kappaleet sisältävät kaksi erillistä, mutta kuitenkin homologista sekvenssiä eikä vain yhden *pspA*-geenin kappaleita. Hybridisointikuvioiden erilaisuuden ja restriktiokappaleiden koon perusteella on selvää, että *pspA*- ja *pspC*-sekvenssit ovat hyvin erilaisia ja että näissä geenialueissa sekvenssi vaihtelee huomattavasti HindIII-tunnistuskohtien sijainnin perusteella määritettynä.

Ne oligonukleotidit, jotka hybridisoituvat vain yhden restriktiokappaleen kanssa kussakin kannassa, oletettiin spesifisiksi *pspA*:n suhteen. Suurella ehdottomuudella LSM3 ja LSM4 ilmaisivat vain yhden *HindIII*-kappaleen niistä kannoista, joiden kanssa ne reagoivat. Restriktiokappaleet, joilla oli homologiaa LSM3- tai LSM4-muodosteiden kanssa, olivat samat kuin ne, jotka hybridisoituvat kaikkien muiden homologisten koettimien kanssa. Tämän perusteella voidaan päätellä, että LSM3 ja LSM4 ilmaisevat spesifisesti *PspA*-sekvenssin eivätkä *pspC*-sekvenssin. Se seikka, että LSM3 hybridisoituu yhden ainoan WU2-restriktiokappaleen kanssa, vahvistaa edelleen sitä oletusta, että tämä oligonukleotidi on spesifinen *pspA*:n suhteen. Toista proliinialuetta ja C-päätettä koodaavasta geeniosasta peräisin olevat sekvenssit (vastaavasti LSM11 ja LSM2) näyttävät olevat suhteellisen spesifisiä *pspA*:n suhteen, koska ne ilmaisevat yleensä vain yhden näistä kunkin kannan HindIII-kappaleista.

Oligonukleotidit LSM12 ja LSM10 kykenivät ilmaisemaan kaikkein säilyneimmät *pspA*-epitoopit ja ne kykenivät yleisesti hybridisoitumaan kunkin kannan monien restriktiokappaleiden kanssa (taulukko 65). LSM7 ei ollut yhtä laajasti ristireaktiivi-

nen, mutta se ilmaisi kaksi *pspA*:ta 41 %:ssa kannoista, mukaan lukien lähes 60 % niistä kannoista, joiden kanssa se reagoi. Näin ollen sekvenssit, jotka edustavat johtajaa, ensimmäistä proliinialuetta sekä toistoaluetta, eivät vaikuta suhteellisen säilyneiltä vain *pspA*-sekvenssien keskuudessa, vaan myös *pspA*- ja *pspC*-sekvenssien
5 välillä. Kaikista oligonukleotideista LSM3, LSM4 ja LSM5 hybridisoituvat pienimmän kantamäärän kanssa (29—35 %), mikä viittaa siihen, että alfa-kierteinen domeeni on vähiten säilynyt alue *pspA*-sekvenssissä. Kannoissa BG58C ja L81905 oligonukleotidit ilmaisevat useamman kuin kaksi sellaista HindIII-kappaletta, jotka sisältävät *pspA*-homologisia sekvenssejä. Koska HindIII-restriktiokohdat puuttuvat
10 näistä kaikista oligonukleotideista, niin epätodennäköistä oli se, että nämä lukuisat kappaleet johtuvat kohdealueissa sijaitsevan kromosomaalisen DNA pilkkoutumisesta. Lisäksi useampi kuin yksi oligonukleotidi ilmaisi suurella ehdottomuudella nämä ylimääräiset restriktiokappaleet. Mahdollista on se, että näissä kahdessa kannassa on kolme tai neljä sellaista sekvenssiä, jolla on DNA-homologiaa joidenkin *pspA*-osien
15 kanssa. Ne koettimet, jotka ovat kaikkein johdonmukaisimmin reaktiivisia näiden ylimääräisten sekvenssien kanssa, ovat johtajan, alfa-kierteisen alueen ja runsaasti proliinia sisältävän alueen koettimet.

Hybridisaatiokoettimina käytettyjen oligonukleotidien kyky toimia alukkeina polyme-
20 raasiketjureaktiossa (PCR) testattiin. 14 *S. pneumoniae* -kannasta, joiden joukossa oli 12 erilaista kapselityyppiä, peräisin oleva *pspA* yritettiin monistaa taulukossa 63 lueteltujen alukkeiden avulla. LSM2, joka on peräisin *pspA*:n 3'-päästä, kykeni monistamaan näennäisen *pspA*-sekvenssin kustakin 14 pneumokokkikannasta, kun sitä käytettiin yhdessä LSM11:n kanssa, joka LSM11 sijaitsee runsaasti proliinia sisältä-
25 vää aluetta koodaavan *pspA*-sekvenssin sisällä. Yhdistelmien, jotka muodostuivat LSM2:sta ja *pspA*-sekvenssissä ylempänä sijaitsevista alukkeista, avulla onnistuttiin monistamaan sekvenssejä vaihtelevalla tavalla (taulukko 65). Pienin monistumistaajuus todettiin koettimella LSM112, joka oli peräisin *pspA*-aloituskohtaan nähden 5' sijaitsevasta Rx1-sekvenssistä. Tätä oligonukleotidiä ei käytetty hybridisointitutki-
30 muksissa. PCR-tekniikalla saaduista DNA-kappaleista muodostettiin täplät ja ne hybridisoitiin täysipituisen *pspA*-koettimen kanssa *pspA*-homologian varmistamiseksi.

Muuta näyttöä *pspA*-geenialueessa esiintyvästä vaihtelusta saadaan monistuneen *pspA*-geenin erilaisten kokojen perusteella. Kun PCR-alukkeita LSM12 ja LSM2 käytettiin koko PspA:ta koodaavan alueen monistamiseksi, niin tällöin erilaisista pneumokokkieristeistä saatujen PCR-tuotteiden koko vaihteli alueella 1,9—2,3 kiloemäsparia. Ne *pspA*-alueet, jotka koodaavat alfa-kierteistä aluetta, runsaasti proliinia sisältävää aluetta ja toistodomeenia, monistettiin vastaavista kannoista ja *pspA*-sekvenssissä esiintyä vaihtelu näyttää olevan peräisin alfa-kierteistä aluetta koodaavassa alueessa sijaitsevista sekvensseistä.

Taulukko 65 *PspA*:n monistaminen PCR-tekniikalla käyttäen mainittuja oligonukleotideja 5'-alukkeina yhdessä 3'-alukkeen LSM2 kanssa

5'-aluke	Alue	Monistuneet/ testattu	Monistuneet %
LSM112	-35 (yläpuolella)	2/14	14
LSM 12	johtaja	8/14	57
LSM3	α-kierre	3/14	21
LSM7	proliini	12/14	86
LSM111	proliini	14/14	100

Näiden tutkimusten avulla on saatu hienommin erotteleva kartta säilyneiden ja vaihtelevien sekvenssien sijainnista *pspA*-sekvenssissä. Lisäksi *pspA*- ja *pspC*-sekvenssien välillä on kyetty tunnistamaan toisistaan poikkeavat ja samanlaiset alueet. Nämä tulokset varmistivat serologiset tutkimukset ja ne osoittivat, että *pspA*- ja *pspC*-sekvensseissä esiintyy erittäin paljon vaihtelua DNA-sekvenssin tasolla. HindIII-entsyymillä *pspA*- ja *pspC*-sekvenssistä saatujen restriktiokappaleiden polymorfismien vaihtelevuus tuki suurempia koettimia käyttäen aikaisemmin saatuja tuloksia, jotka ilmaisivat DNA:n huomattavaa vaihtelua näissä sekvensseissä ja niiden ympärillä.

Käyttökelpoisen *pspA*-spesifisen DNA-koettimen pitäisi tunnistaa Rx1 ja WU2 *pspA*-geenit, joiden restriktiokartat tunnetaan, ja sen pitäisi tunnistaa vain yksi restriktiokappale useimmista kannoista. Kaksi koetinta, LSM3 ja LSM4, ei hybridisoidu useamman kuin yhden HindIII-restriktiokappaleen kanssa missään pneumokokkikannassa. Nämä molemmat oligonukleotidit hybridisoituvat Rx1 *pspA*:n kanssa ja LSM3 hybridisoituu WU2 *pspA*:n kanssa. Kuitenkin kumpikin näistä koettimista hybridisoituu muista 15 kannasta vain neljän kanssa. Kuitenkin, kun nämä koettimet tunnistavat kappaleen, niin yleensä myös kaikki muutkin RX1-peräiset koettimet tunnistavat sen. *PspA*:n toisesta, runsaasti proliinia sisältävästä alueesta peräisin oleva oligonukleotidi (LSM111) ja sen C-päätteestä peräisin oleva oligonukleotidi (LSM2) tunnistavat yleensä vain yhden *pspA*-homologisen sekvenssin suurella ehdottomuudella. Yleisesti, LSM111, -2, -3 ja -4 reagoivat näistä 17 eristeestä 16 kanssa ja ne paljastivat kussakin tapauksessa useimpien tai kaikkien oligonukleotidikoettimien tunnistaman yleispätevän DNA-kappaleen.

Kun oligonukleotidikoetin ilmaisi vain yhden DNA-kappaleen, niin sen oletettiin olevan *pspA*. Mikäli koetin ilmaisi lukuisia kappaleita, niin sen oletettiin hybridisoituvan *pspA*:n kanssa. Mikäli koetin ilmaisi lukuisia kappaleita, niin sen oletettiin hybridisoituvan *pspA*- ja *pspA*-sekvenssien kanssa. Näiden oletusten perusteella vaihtelevin alue *pspA*:n ja *pspC*:n välillä on se alue, joka sijaitsee välittömästi -35-promoottorialueen ja alfa-kierteistä aluetta koodaavan osan yläpuolella. Kaikkein säilyneimmäksi osaksi *pspA*:n ja *pspC*:n välillä todettiin toistoaluesekvenssi, johtosekvenssi ja runsaasti proliinia sisältävän alueen sekvenssi. Vaikka tässä käytettiinkin vain yhtä, toistoalueeseen sisältyvää koetinta, niin Rx1-sekvenssin 10 toiston keskuudessa todetun suuren säilymisasteen perusteella on todennäköistä, että muillakin toistosekvensseihin sisältyvillä koettimilla saadaan samankaltaisia tuloksia.

Kaikkein eniten *pspC*-sekvenssiä muistuttava Rx1 *pspA*:n osa oli se, johon oli koodautunut johtopeptidi, runsaasti proliinia sisältävän alueen yläosa sekä toistoalue. PspA:n toistoalueen on näytetty osallistuvan tämän proteiinin kiinnittymiseen pneumokokin soluseinämään. Toistoalueen säilyminen *pspC*-sekvensseissä viittaa siihen, että jos nämä geenialueet koodaavat proteiinia, niin siinä saattaa olla saman-

kaltainen toiminnallinen kiinnittymisalue. Johtosekvenssin säilyminen *pspA*- ja *pspC*-sekvenssin välillä ei ollut myöskään yllättävää, sillä samankaltaista säilymistä on esitetty myös muiden, gram-positiivisista eliöistä peräisin olevien proteiinien johtosekvenssille, esimerkkinä A-ryhmään kuuluvien streptokokkien M-proteiini (Haanes-Fritz, E. et al., Nucl. Acids Res. 1988; 16: 4667—4677).

Eräät oligonukleotidikoettimet tunnistivat kahdessa kannassa useampia kuin kaksi *pspA*-homologista sekvenssiä. Näissä kannoissa oli hallitseva sekvenssi, jonka lähes kaikki koettimet tunnistivat, ja kaksi tai kolme lisäsekvenssiä on homologisia johtoaluetta, alfa-kierteistä aluetta ja proliinialuetta koodaavan DNA:n kanssa, ja ne eivät ole lainkaan homologisia PspA:n C-päätteessä sijaitsevaa toistoaluetta koodaavien sekvenssien kanssa. Nämä sekvenssit saattavat toimia kasetteina, jotka voivat yhdistyä uudestaan *pspA*- ja/tai *pspC*-sekvenssien kanssa antigeenisen monimuotoisuuden tuottamiseksi. Vaihtoehtoisesti nämä sekvenssit saattavat koodata proteiineja, joissa on hyvin erilaiset C-päätteen alueet, ja joiden kiinnittyminen pintaan ei tapahdu samalla mekanismilla kuin PspA:n tapauksessa.

Vain yhteen kromosomaaliseen DNA-kappaleeseen hybridisoituvia oligonukleotideja käytettiin alukkeina PCR-tekniikassa *pspA*-geeniin sisältyvien domeenien vaihtelevuuden tutkimiseksi. Nämä tulokset osoittavat, että täysipituisen *pspA*:n koko vaihtelee pneumokokkikantojen keskuudessa, ja että tämä vaihtelu johtuu lähes yksinomaan alfa-kierrettä koodaavan alueen sekvensseistä.

Esimerkki 12 - PspC:n kloonaaminen

Kromosomaalista DNA:ta eristettiin serotyyppiä 6A olevasta kliinisestä *S. pneumoniae* EF6796-eristeestä menetelmillä, joissa käytettiin puhdistamista kesiumkloridigradientin avulla esimerkissä 8 kuvatulla tavalla. EF6796-kannan HindII-EcoRI-kappale kloonattiin muokattuun pZero-vektoriin (Invitrogen, San Diego, CA), jossa Zeocin-vastustuskyvyn kasetti korvattiin kanamysiinikasetilla (esitetty kuviossa 18). Yhdistelmätekniset plasmidit siirrettiin sähköisesti *Escherichia coli* TOP10F'-

soluihin [F'-{*lac*I°Tet^r} *mrc*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *deo*R *rec*A1 *araD*139 Δ(*ara-leu*)7967 *gal*U *gal*K *rps*L *end*A1 *nup*G] (Invitrogen).

pspA.Rx1:n 5'-alue ei hybridisoidu *pspC*-sekvenssiin suurilla ehdottomuuksilla Southern-analyysien perusteella. Sekä täysipituista Rx1 *pspA*-koetinta että PspA:n alfa-kierteistä aluetta koodaavan sekvenssin sisältävää koetinta käyttäen oli mahdollista tunnistaa se, mikä DNA-kappale sisälsi *pspA*-geenialueen ja mikä kappale sisälsi *pspC*-geenialueen. EF6796-kannan *pspC*-geenialue ja *pspA*-geeni kartoitettiin restriktioentsyymien avulla. Sen jälkeen, kun kromosomaalinen DNA oli pilkottu entsyymillä HindIII, *pspC*-geenialue paikannettiin noin 6,8 kb:n kappaleeseen. Entsyymeillä HindIII ja EcoRI toteutetun kaksinkertaisen pilkkomisen jälkeen *pspC*-geenialue paikannettiin 3,5 kb:n suuruiseen kappaleeseen. Ehjän *pspC*-geenin saamiseksi kannasta EF6796 kromosomaalinen DNA pilkottiin entsyymillä HindIII, erotettiin elektroforeettisesti agaroosigeelillä, 6 kb:n ja 7,5 kb:n välinen kokoalue puhdistettiin ja pilkottiin tämän jälkeen entsyymillä EcoRI. Tämä pilkottu DNA analysoitiin elektroforeesilla ja DNA-kappaleet, joiden koko oli alueella 3,0—4,0 kb, puhdistettiin (GeneClean, Bio101, Inc., Vista, CA). Sitten tämä koon perusteella fraktioitu DNA ligatoitiin entsyymeillä HindIII ja EcoRI pilkottuun pZero-vektoriin ja siirrettiin sähköisesti *E. coli* TOP10F'-soluihin. Kanamysiinille vastustuskykyiset transformantit seulottiin pesäketäplien avulla ja niihin liitettiin koettimeksi täysipituinen *pspA*. Yksi transformantti eli LXS200 sisälsi vektorin, joka käsitti *pspA*:han hybridisoituvan, 3,5 kb:n istutteen.

Muodosteen pLXS200 sisältämän *pspC*:n sekvenssimääritys toteutettiin käyttäen automaattista DNA-sekvenssimääritystä laitteella ABI 377 (Applied Biosystems, Inc., PLACE). Sekvenssianalyysi toteutettiin Wisconsin:in yliopiston geeniryhmän tietokoneohjelmilla (University of Wisconsin Genetics Computer Group; GCG) AIDS-tutkimusryhmän (Center for AIDS Research; P30 AI27767) tuella, sekä ohjelmilla MacVector 5,0, Sequencer 2.1 sekä DNA Strider. *PspC*-sekvenssien samankaltaisuudet määritettiin NCBI BLAST-palvelimen avulla. *pspC*-sekvenssin perusteella ennustettu kiertynyt käämimäinen rakenne analysoitiin Matcher-laitteella.

Geenikoetin *pspC*-geenialueen klonaamiseksi

Kahta oligonukleotidialuketta, N192 ja C558 (esitetty kuviossa 19) on käytetty aikaisemmin eri pneumokokkikannoista peräisin olevia aminohappoja 192—588 koodaavan Rx1 *pspA*-alueen kanssa homologisten kappaleiden kloonaamiseksi. Nämä alukkeet on saatu muokkaamalla (restriktiokohtia muutettu) muodosteita LSM4 ja LSM2, joiden on osoitettu aikaisemmin monistavan sitä DNA:ta, johon PspA.Rx1:n C-päätteen 396 aminohappoa ovat koodautuneet (kuvio 17); niihin sisältyvät noin 100 alfa-kierteisen alueen aminohappoa, runsaasti proliinia sisältävä alue sekä C-päätteessä sijaitseva, koliinia sitova toistoalue. Kannasta EF6796 peräisin oleva 1,2 kb:n kappale monistettiin PCR-reaktiolla käyttäen alukkeita N192 ja C558, mitä seurasi kloonaaminen muodosteeseen pET-9A (jolloin saadaan PRCT135). Sitten tämän istutteen sekvenssi määritettiin osittain.

Tästä riippumatta kannasta EF6796 valmistetiin suurempi *pspA*-kappale käyttäen alukkeita LSM13 ja SKH2 (esitetty kuviossa 19), jotta serologisesti erilaisten *pspA*-geenien sekvenssi voitaisiin määrittää suoraan.

LSM13:n ja SKH2:n muodostama alukepari johtaa useimpien niiden *pspA*-geenien 5'-pään monistumiseen, joihin *pspA*-geeneihin ovat koodautuneet ylempi promoottori, johtopeptidi, alfa-kierteinen alue ja runsaasti proliinia sisältävä alue (aminohapot -15 - 450) (kuvio 20). LSM13- ja SKH2-alukkeet monistivat EF6796-kannasta 1,3 kb:n kappaleen (*pspA.EF6796*), jonka sekvenssi määritettiin. Muodosteesta pRCT135 saatu sekvenssi ja LSM13/SKH2 PCR-tekniikalla tuotettu kappale *pspA.-EF6796* eivät olleet samanlaiset. PCR-tekniikalla ja alukkeiden LSM13 ja SKH2 avulla saatu kappale todettiin *pspA*:ksi perustuen siihen, että se sijaitsi samassa kromosomiasemassa kuin *pspA.Rx1*. Muodosteessa pRCT135 läsnä olevan kloonatun kappaleen oletettiin edustavan toisen geenialueen eli *pspC*:n sekvenssiä, jonka tiedetään olevan läsnä Southern-analyysin perusteella. Molemmat geenit muistuttavat merkittävästi Rx1-kannasta peräisin olevan prototyyppi-*pspA* -geenin vastaavia alueita. Toista geeniasemaa kutsuttiin *pspC*:ksi sen perusteella, että se sijaitsi

kromosomissa eri asemassa, eikä sen perusteella, että sen sekvenssi erosi prototyyppi-*pspA* -geenistä.

PspC EF6796:n nukleotidi- ja aminohapposekvenssin määritys

Jotta saataisiin varmennetuksi se hypoteesi, että pRCT135 edusti EF6796:n *pspC*:ta, ja jotta *pspC*:ta voitaisiin tutkia edelleen, koko EF6796 *pspC*-geeni kloonattiin 3,4 kb:n HindIII-EcoRI-kappaleena, jolloin saatiin muodoste pLXS200. Tämän *pspC*:n sisältävän pLXS200-kloonin DNA-sekvenssi paljasti 2782 nukleotidin suuruisen avoimen lukukehyksen kopioinnin ja luennan oletettujen alkamis- ja päättymiskohtien analyysin perusteella (kuvio 21). Tähän ennustettuun avoimeen lukukehykseen on koodautunut 105 kDa:n proteiini, jonka arvioitu pI on 6,09.

PspA.Rx1 ja PspC.EF6796 ovat siinä suhteessa samankaltaisia, että ne kumpikin sisältävät alfa-kierteisen alueen ja sen jälkeen runsaasti proliinia sisältävän alueen ja toistoalueen (kuvio 20). PspC:n aminohapposekvenssillä on kuitenkin useita sellaisia piirteitä, jotka ovat hyvinkin selvästi erilaisia kuin PspA:ssa. Nukleotidisekvenssin sekä ennustetun aminohapposekvenssin vertaamisen perusteella on ilmeistä, että PspC:n ja PspA:n välillä voimakkaasti homologinen alue alkaa PspC:n aminohappoasemasta 458 (PspA:n aminohappo 147) ja ulottuu kummankin proteiinin C-päätteeseen saakka (vastaavasti asemat 899 ja 588). PspC.EF6796:n ja PspA.Rx1:n ennustetut aminohapposekvenssit ovat 76-prosenttisesti samankaltaisia ja 68-prosenttisesti samanlaisia GCG Bestfit-ohjelman perusteella tässä alueessa (kuvio 22). *pspC*:n ja *pspA*:n nukleotidisekvenssit ovat 87-prosenttisesti samanlaiset tässä samassa alueessa. Kahdeksan emästä, jotka sijaitsevat ennen ATG-aloituskohtaa, muodostavat oletetun ribosomin sitoutumiskohdan, TAGAAGGA. Todennäköiset kopioitumisen alkamisalueet -35 (TATACA) ja -10 (TATAGT) sijaitsevat asemien 258—263 ja 280—285 välissä, vastaavasti (kuvio 21). Mahdollinen kopioitumisen päättäjä esiintyy nukleotidien 3237 ja 3287 välissä sijaitsevassa runkosilmukassa. PspC:n oletettu signaalisekvenssi on tyypillinen muille gram-positiivisille bakteereille. Tämä alue koostuu varautuneesta aminohappoalueesta, jota seuraa aminohapoista muodostuva hydrofobinen ydin. Signaalipeptidin mahdollinen pilkkoutumiskohta sijaitsee amino-

happoasemassa 37 sekvenssin Val-His-Ala jälkeen. Kypsän proteiinin ensimmäinen aminohappo on Glu-jäännös.

pspA ja *pspC* eivät ole homologiset tässä alueessa lukuunottamatta kaikissa signaalisekvensseissä samankaltaisia piirteitä. Tämä vahvistaa sen, että *pspC* on läsnä eri kromosomiasemassa kuin *pspA*. Signaalisekvenssi ja sen yläpuolinen alue ovat hämmästyttävällä tavalla samankaltaiset kuin *S. agalactiae* ß-antigeenin (talletusnumero X59771) samankaltaiset alueet. Tämä B-ryhmään kuuluvan streptokokin ß-antigeeni on solupintareseptori, joka sitoo IgA:ta. Samankaltaisuus *bac*-geenin kanssa päättyy siihen, mistä kypsä PspC-proteiini alkaa, ja nukleotidit ovat 75-prosenttisesti samanlaiset tässä alueessa. Näin ollen, vaikka *pspC* onkin hyvin samankaltainen kromosomiasema ß-antigeeniin verrattuna, niin se on kuitenkin erillinen proteiini.

PspC:n N-pääte eroaa melko paljon PspA:n N-päätteestä. Sekundäärirakenteen ennustaminen Chou-Fausman-analyysin (Chao, P.Y. et al., Adv. Enzymol. Relat Areas Mol. Biol. 1978: 47: 45—148) avulla viittaa siihen, että PspC:n aminohappojen 16—589 rakenne on pääasiassa alfa-kierteinen. Matcher-ohjelman avulla selvitettiin jaksollisuutta PspA:n alfa-kierteisessä alueessa. Tunnusomainen, seitsemän jäännöksen jaksollisuus säilyy siten, että ensimmäisessä ja neljännessä asemassa (a ja d) on kulloinkin hybrofobinen jäännös ja hydrofobinen jäännös muissa asemissa. PspC:n alfa-kierteen kiertyneessä käämimäisessä alueessa (aminohappojen 32 ja 600 välissä) on kolme epäjatkuvuuskohtaa seitsenarvoisessa toistossa (kuvio 23). Nämä häiriöt tässä seitsemän jäännöksen jaksollisuudessa esiintyvät aminohappoasemissa 99—104, 224—267 ja 346—350. PspA:n alfa-kierteisessä alueessa on seitsemän rakenteen rikkovaa kohtaa, joista kunkin koko on muutamasta aminohaposta 23 aminohappoon. Sitä vastoin PspC:n kiertyneessä käämimäisessä rakenteessa olevat kolme rakenteen rikkovaa kohtaa käsittävät vastaavasti 5, 43 ja 4 aminohappoa.

PspC:n alfa-kierteistä aluetta koodaava sekvenssi sisältää kaksi suoraa toistoa, joiden pituus on 483 nukleotidiä (160 aminohappoa), ja jotka ovat 88-prosenttisesti identtiset nukleotiditasolla. Nämä kummatkin toistot, jotka esiintyvät nukleotidien 562—1045 ja nukleotidien 1312—1795 välissä, ovat säilyneet sekä nukleotidi- että

aminohappotasolla (aminohapot 188—348 ja 438—598) (kuviot 24). PspA:n tapauksessa ei olla todettu mitään näyttöä mistään näin selvistä toistoista alfa-kierteisessä alueessa. Nämä toistuvat alueet saattavat toimia mekanismina uusien yhdistymien muodostamiseksi, jotka uudet yhdistymät voivat muuttaa PspC-molekyylin N-päätteen puolta. Vaikka toistuvat rakenteet ovatkin yleisiä bakteereiden pintaproteiineissa, niin kuitenkin näin suuri suora toisto tai suuren välialueen erottama toisto on uusi. Tämän alueen kehityshistoriallista merkitystä ei tunneta. Toistoalueen ja niiden välisten 267 nukleotidiemäksen Blast-haku ei paljastanut mitään sellaista sekvenssiä, jolla olisi merkittävää homologiaa nukleotidi- tai aminohappotasolla. Kuitenkin yksi näistä rakenteen epäjatkuvuuskohdista PspC:n kiertyneessä käämimäisessä alueessa on näiden kahden toiston välinen alue. Pieni poikkeama näiden kahden toiston välisessä kiertyneessä käämimäisessä rakenteessa saattaa olla kriittistä alfa-kierteisen rakenteen säilymistä ajatellen.

Aikaisemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että PspA:n suuri ristisuojaava alue käsittää C-päätteen puoleisen 1/3 alfa-kiertyneestä alueesta (PspA.Rx1-jäännösten 192 ja 260 välissä). Tämä alue vastaa sitoutumisesta neljässä viidestä ristisuojaavasta immuniteetista hiirissä. PspC:n ja PspA:n välinen homologia alkaa pspA:n aminohaposta 148, joten se sisältää alueen 192—299. PspA:n ja PspC:n välinen homologia sisältää PspC-sekvenssistä aminohapoon 486 nähden koko C-päätteen puolen. Sen perusteella, että PspA ja PspC ovat niin samankaltaiset tässä alueessa, jonka tiedetään saavan aikaan suojan, PspC on myös todennäköisesti suojan aikaansaava molekyyli. Koska näiden proteiinien sekvenssi ja avaruusrakenne ovat hyvin samankaltaisia tässä alueessa, niin PspA:n tämän, aminohappojen 148 ja 299 välisen alueen suhteen spesifisten vasta-aineiden tulisi ristireagoida PspC:n kanssa ja tuottaa näin ollen suoja reagoimalla PspC:n ja PspA:n kanssa. Samoin odotettavaa on, että immunointi PspC:lla tuottaa vasta-aineita, jotka ovat ristisuojaavia pspA:ta vastaan. Kannasta EF6796 peräisin olevan PspC:n ja kannasta Rx1 peräisin olevan PspA:n välinen ero ei ole suurempi kuin erot monien sellaisten ylimääräisten PspA-proteiinien välillä, joiden on osoitettu olevan hyvin ristisuojaavia.

Runsaasti proliinia sisältävä alue esiintyy aminohappojen 590 ja 652 välissä. Sekvenssi PAPAPEK toistuu kuusi kertaa tässä alueessa. Tämä alue on hyvin samankaltainen kuin runsaasti proliinia sisältävä alue PspA.Rx1:ssa, jonka sisältämä sekvenssi PAPAP toistuu kahdeksan kertaa kahdessa runsaasti proliinia sisältävässä alueessa. Näitä kahta PspA.Rx1:n aluetta erottaa toisistaan 27 varautunutta aminohappoa; mitään tällaista välialuetta ei ole läsnä PspC:ssa.

Monet muidenkin gram-positiivisten bakteereiden solupinnan proteiinit sisältävät runsaasti proliinia sisältäviä alueita. Ne ovat usein liittyneet sellaiseen proteiinialueeseen, jonka ennustetaan sijaitsevan lähellä soluseinämän mureiinikerrosta, kun proteiini on liittynyt soluun. Esimerkiksi *S. pyogenes* -eliön M-proteiineissa tämä domeeni sisältää sekä Pro- että Gly-rikkaita alueita. Eliöistä *S. pyogenes, S. dysgalactiae* sekä *Staphylococcus aureus* peräisin oleva, fibronektiiniä sitova proteiini sisältää runsaasti proliinia sisältävän alueen, jossa on kolmesta jäännöksestä muodostuvaa jaksollisuutta (varausmielinen - varautumaton), jollaista ei esiinny PspA:ssa eikä PspC:ssa. *S. equi* -eliön M-kaltainen proteiini sisältää runsaasti proliinia sisältävän alueen, joka muodostuu tetrapeptidistä PEPK. Tästä alueesta puuttuu glysiini, jota esiintyy tavallisesti M-proteiinien proliinialueissa. Tässä molekyylissä viimeinen proliinia sisältävä toistoalue on PAPAK, joka muistuttaa enemmän PspA:n ja PspC:n proliinialuetta kuin M-proteiineja.

Alalla on esitetty jo aikaisemmin, että gram-positiivisista bakteereista peräisin olevat, runsaasti proliinia sisältävät alueet kulkevat soluseinämän läpi. Erot erilaisista bakteereista peräisin olevien proteiinien proliinirikkaissa alueissa saattavat vaikuttaa proteiinitoiminnon eroihin tai mahdollisesti hienoihin eroihin soluseinämän toiminnossa. Proliinirikkaiden alueiden oletetaan aiheuttavan näiden proteiinien poikkeuksellista liikkumista SDS-polyakryyliamidigeeleillä.

PspC:n toistoalue on gram-positiivisten eliöiden useiden proteiinien keskuudessa yleisesti esiintyvä rakenne. *S. pneumoniae*:n autolysiini, *Clostridium difficile*:n A ja B-toksiinit, *S. downei*:sta ja *S. mutans*:sta peräisin olevat glukotransferaasit sekä *C. acetobiltylicum*:in CspA sisältävät kaikki samankaltaisia alueita. PspA:ssa nämä

toistot vastaavat sitoutumisesta pneumokokkien soluseinämässä esiintyvän teikoiinihapon ja lipoteikoiinihapon fosfatidyylikoliiniin. Kuitenkin C-päätteen toistoja sisältäviä bakteeriproteiineja erittyy, mikä saattaa viitata joko menetettyyn tai saavutettuun toimintoon. Vaikka näissä kaikissa proteiineissa onkin samankaltaisia toistoalueita, niin PspA:n ja PspC:n toistoalueiden samankaltaisuus on paljon suurempi kuin PspC:n ja muiden proteiinien välillä (taulukko 66).

Mielenkiinnolla voidaan todeta, että sekä PspC:ssa että PspA:ssa on 17 aminohaposta muodostuva, osittain hybrofobinen häntä. Tämän 17 aminohaposta muodostuvan alueen tehtävää ei tunneta. PspA:n tapauksessa ollaan todettu, että mutantit, joista tämä häntä puuttuu, sitoutuvat pneumokokkien pintaan samoin kuin PspA:t, joissa häntä on ilmentynyt. Tällä hetkellä ei tiedetä, kiinnittyykö PspC solupintaan vai erittyykö se.

Sekä PspA-proteiinissa että PspC-proteiinissa on alfa-kierteinen käämimäinen kiertynyt rakenne, runsaasti proliinia sisältävä keskialue, toistoalue koliinia sitovine rakenteineen sekä 17 aminohaposta muodostuva C-päätteen häntä. PspA:ssa ja PspC:ssa on kolme yhteistä aluetta, joissa sekvenssit ovat hyvin samanlaiset. Yksi näistä on suojan aikaansaava alue, joka on läsnä alfa-kierteisessä domeenissa. Kaksi muuta aluetta ovat proliinirikas domeeni ja toistodomeeni, jollaisia esiintyy myös muissa koliinia sitovissa proteiineissa ja joiden oletetaan osallistuvan solupintaan liittymiseen. Samankaltaisuus suurimmassa osassa PspA- ja PspC-molekyylien rakennetta viittaa siihen mahdollisuuteen, että näillä kahdella molekyylillä on vähintään jonkin verran päällekkäiset tehtävät. Kuitenkin se seikka, ettei tämän proteiinin N-päätteen puoli ole homologinen PspA:n minkään alfa-kierteisen sekvenssin kanssa, viittaa siihen, että PspC ja PspA ovat saattaneet kehittyä solun pinnalla ainakin jonkin verran erilaisista syistä. Eräs silmiinpistävimmistä eroista näiden kahden molekyylin välillä on vain yksi ainoa toisto PspC:n alfa-kierteisessä alueessa. Vaikkei PspA:n eikä PspC:n täsmällistä tehtävää tunnetakaan, niin kuitenkin se havainto, että PspA:n suuri ristisuojaava alue on erittäin homologinen PspC:n samankaltaisen alueen kanssa, viittaa siihen mahdollisuuteen, että molemmat molekyylit saavat aikaan suojan ja tuottavat ristisuojaavia vasta-aineita.

B-ryhmään kuuluvista streptokokeista peräisin olevan *pspC*-geenin ja *bac*-geenin promoottorialueen välinen sekvenssien samankaltaisuus on hyvin hämmentävää. Se merkitsee, että lajien välillä on tapahtunut uudelleenyhdistymistä ja tämä lajien välinen uudelleenyhdistyminen on myötävaikuttanut *pspC*:n kehittymiseen. Näin ollen tällä *pspC*-geenillä on kimeerinen rakenne, ollen osittain *pspA*:n kaltainen ja osittain ß-antigeenin kaltainen. Viimeksi mainitussa tapauksessa kaikki proteiinien välinen samankaltaisuus on rajoittunut signaalisekvenssiin. Samankaltaiset lajien väliset, uudelleenyhdistymiseen johtaneet tapahtumat ovat myötävaikuttaneet penisilliiniä sitovaa proteiinia koodaavien geenien kehittymiseen.

Analogisia toimenpiteitä käyttäen toinen PspC-sekvenssi eristettiin *S. pneumoniae* D39-kannasta. Kuviot 25-29 esittävät D39-kannasta saadun sekvenssin sekvenssitietoja, jotka ovat täydelliset alkaen ennen promoottoria sijaitsevasta alueesta proliinirikkaaseen alueeseen saakka. Kannalla D39 on sama geenitausta kuin kannalla Rx1, josta *pspA*:n sekvenssi määritettiin. Kannoilla D39 ja Rx1 on sama *pspC*-geeni Southern blot -analyysin perusteella.

D39 *pspC*-geenin alfa-kierteinen koodaava alue on kooltaan kolmasosa EF6796 *pspC*-geenistä peräisin olevasta homologisesta alueesta. D39 *pspC*-geenin proliinirikas alue muistutti enemmän Rx1 *pspA*:ta kuin EF6796 *pspC*:ta. Tästä huolimatta nämä kaksi *pspC*-geeniä olivat 86-prosenttisesti identtiset nukleotidisekvenssinsä suhteen ja 67-prosenttisesti identtiset aminohappotasolla.

EF6797 *pspC*:n alfa-kierteisessä sekvenssissä havaittiin voimakas toisto. Se puuttui D39 *pspC*-sekvenssistä. D39 *pspC*-sekvenssistä puuttuu myös johtosekvenssi, joka on läsnä EF6797 *pspC*-sekvenssissä.

Nämä tulokset viittaavat vahvasti siihen, että *pspC*:n rakenteessa esiintyy vaihtelua, kuten aikaisemmin on todettu myös *pspA*:n yhteydessä. Kuitenkin *pspC*:n tapauksessa tämän vaihtelun voimakkuus näyttää olevan suurempaa kuin mitä on todettu *pspA*:lle.

Taulukko 66

Koliinia sitovien alueiden homologisuus, %			
			prosenttia samankaltaisuus/ identtisyys
Proteiini	Eliö	PspA	PspC
PspC	*S. pneumoniae*	86/60	100/100
Bakteriofaagi Cp-1	*S. pneumoniae*	56/30	56/28
LytA	*S. pneumoniae*	57/33	61/32
PspA	*C. perfringens*	64/45	59/42
alfa-toksiini	*C. novyi*	54/29	57/33
CspB	*C. acetobutylicum*	58/36	61/45

Vaikka ohessa onkin kuvattu yksityiskohtaisesti esillä olevan keksinnön tiettyjä edullisia suoritusmuotoja, niin kuitenkin on selvää, etteivät nämä edellä olevassa kuvauksessa esitetyt erityiset yksityiskohdat rajoita liitteenä olevissa patenttivaatimuksissa määriteltyä keksintöä, vaan että monet ilmeiset muunnokset ovat mahdollisia keksinnön hengestä ja tavoitteista kuitenkaan poikkeamatta.

VIITTAUKSET

1. Alexander, J.e., Lock, R.A., Peeters, C.C.A.M.., Poolman, J.T., Andrew, P.W., Mitchell, T.J., Hansman, D., Paton, J.C., Immunization of mice with pneumolysin toxoid confers a signinficant degree of protection against at least nine serotypes of *Streptococcus pneumoniae*, Infection and Immunity 1994, **62**:5683—5688.

2. Amsbaugh, D.F., Hansen, C.T., Prescott, B., Stashak, P.W., Barthold, D.R., Baker, P.J., Genetic control of the antibody response to type III pneumococcal polysaccharide in mice. I. Evidence that an X-linked gene plays a decisive role in determining responsiveness, J. Exp. Med. 1972, **136**:931—949.

3. Anonymous, Pneumococcal polysaccharide vaccine, MMWR 1981, **30**:410—419.

4. Austrian, R., Pneumococcal Vaccine: Development and Prospects, Am. J. Med. 1979, **67**:547—549.

5. Avery, O.T., McLeod, C.M., and McCarty, M., Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types, Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III., J. Exp. Med. 1944, **79**:137—158.

6. Avery, O.T., Goebel, W.F., Chemoimmunological studies of the soluble specific substance of pneumococcus. I., The isolation and properties of the acetyl polysaccharide of pneumococcus type I, J. Exp. Med. 1933, **58**:731—755.

7. Badenes, M.J., and Dan E. Parfitt, Reducing background and interference on Southern Blots probed with nonradioactive chemiluminescent probes, BioTechniques 1994, **17**:622—624.

8. Berry, A.M., Yother, J., Briles, D.E., Hansman, D., Paton, J.C., Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*, Infect. Immun. 1989, **57**:2037—42.

9. Berry, A.M., Lock, R.A., Hansman, D., Paton, J.C., Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*, Infect Immun 1989, **57**:2324—30.

10. Birnboim H.C. and J. Doly, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, Nuc. Acids Res., 1979, **7**:1513.

11. Briese, T., Hakenbeck, R., Interaction of the pneumococcal amidase with lipoteichoic acid and choline, 1985, **146**:417—427.

12. Briles, D.E., J. Yother and L.S. McDaniel, Role of pneumococcal surface protein A in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*, Rev. Infect. Dis. 1988, **10**:S372—374.

13. Briles, D.E., Horowitz, J., McDaniel, L.S., Benjamin, W.H., Jr., Claflin, J.L., Booker, C.L., Scott, C., Forman, C. Genetic control of suspectibility to pneumococcal infection, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1986, **124**:103—120.

14. Briles, D.E., Forman, C., Horowitz, J.C., Volanakis, J.E., Benjamin, W.H., Jr., McDaniel, L.s., Eldridge, J., Brooks, J., Antipneumococcal effects of C-reactive protein and monoclonal antibodies to pneumococcal cell wall and capsular antigens, Infect. Immun. 1989, **57**:1457—1464.

15. Briles, D.E., Nahm, M., Schroer, K., Davie, J., Baker, P., Kearney, J., Barletta, R., Antiphosphocholine antibodies found in normal mouse serum are protective against intravenous infection with type 3 *Streptococcus pneumoniae*, J. Exp. Med. 1981, **153**:694—705.

16. Briles, D.E., M.J. Crain, B.M. Gray, C. Forman and J. Yother, A strong association between capsular type and mouse virulence among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*, Infect. Immun. 1992, **60**:111—116.

17. Briles, D.E., Forman, C., Crain, M., Mouse antibody to phosphocholine can protect mice from infection with mouse-virulent human isolates of *Streptococcus pneumoniae*, Infect. Immun. 1992, **60**:1957—62.

18. Brooks-Walter, A. McDaniel, L.S., Hollingshead, S.K., Briles, D.r., Restriction fragment length polymorphisms of *pspA* of *Streptococcus pneumoniae* reveala genetic polymorphism, Submitted.

19. Brooks-Walter, A. and L.S. McDaniel, 1994, Unpublished data.

20. Cadoz, M., J. Armand, F. Arminjon, J.-P. Michel, M. Michel, F. Denis and G. Schiffman, a new 23 valent pneumococcal vaccine: immunogenicity and reactogenicity in adults, J. Biol. Stand. 1985, **13**:261.

21. Chiu, S.S., Greenberg, P.D., Marcy, S.M., Wong, V.K., Chang, S.J., Chiu, C.Y., Ward, J.I., Mucosal antibody responses in infants following immunization with *Haemophilus influenzae*, Pediatr. Res. Abstracts 1994, **35**:10A.

22. Cohen, C., Parry, D.A.D., alpha-helical coiled coils: more facts and better predictions, Science 1994, **236**:488—9.

23. Cowan, M.J., Ammann, A.J., Wara, D.W., Howie, V.M., Schultz, L., Doyle, N., Kaplan, M., Pneumococcal polysaccharide immunization in infants and children, Pediatrics 1978, **62**:721—727.

24. Crain, M.J., Unpublished data.

25. Crain, M.J., Waltman, W.D., II, Turner, J.S., Yother, J., Talkington, D.E., McDaniel, L.M., Gray, B.M., Briles, D.E., Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*, Infect. Immun. 1990, **58**:3293—3299.

26. Dagen, R., Melamed, R., Abramson, O., Piglansky, L., Greenberg, D., Mendelman, P.M., Bohidar, N., Terminassian, D., Cvanovich, N., Lov, D., Rusk, C., Donnelly, J., Yagupsky, P., Effect of heptavalent pneumococcal-OMPC conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage when administered during the 2nd year of life, Pediatr. Res. 1995, **37**:172A.

27. Davis, R.W., Soststein, D., Roth, J.R., In: A manual for genetic engineering - advanced bacterial genetics, Cold Spring Harbor, NY (Cold Spring Harbor Laboratory Press) 1980.

28. Dillard, J.P., Yother, J., Genetic and molecular characterization of capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* type 3, Mol. Micorbiol. 1994, **12**:959—972.

29. Douglas, R.M. and H.B. Miles, Vaccination against *Streptococcus pneumonae* in childhood: lack of demonstrable benefit in young Australian children, J. Infect. Dis. 1984, **149**:861.

30. Douglas, R.M., J.C. Paton, S.J. Duncan and D.J. Hansman, Antibody response to pneumococcal vaccination in children younger than five years of age, J. Infect. Dis., 1983, **148**:131.

31. Farley, J.J., King, J.C., Nair, P., Hines, S.E., Tressler, R.L., Vink, P.E., Invasive pneumococcal disease among infected and uninfected children of mothers with immunodeficiency virus infection, J. Pediatr. 1994, **124**:853—858.

32. Fattom, A., Vann, W.F., Szu, S.C., Sutton, A., Bryla, D., Shiffman, G., Robbins, J.B., Schneerson, R., Synthesis and physiochemical and immunological characterization of pneumococcus type 12F polysaccharide-diphtheria toxoid conjugates, Infect. Immun. 1988, **56**:22924,34 2298.

33. Fedson, D.S., Pneumococcal vaccination in the prevention of community-acquired pneumonia: an optimistic view of cost-effectiveness, Sem. Resp. Infect. 1993, **8**:285—293.

34. Feldman, C., Munro, W.C., Jeffery, P.K., et al., Pneumolysin induces the salient histologic features of penumococcal infection in the rat lung *in vivo*, Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 1992, **5**:416—23.

35. Filice, G.A., L.L. Van Etta, C.P. Darby and D.W. Fraser, Bacteremia in Charleston County, South Carolina, Am. J. Epidemiol., 1986, **123**:128.

36. Fischetti, V.a., Pancholi, V., Schneewind, O., Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci, Mol. Microbiol., 1990, **4**:1603—1605.

37. Forrester, H.L., D.W. Jahigen and F.M. LaForce, Inefficacy of pneumococcal vaccine in a high-risk population, Am. J. Med. **83**:425.

38. Garcia, J.L., Garcia, E., Lopez, R., Overproduction and rapid purification of the amidase of *Streptococcus pneumoniae*, Arch. Microbiol. 1987, **149**:52—56.

39. Giebink, G.S., Preventing pneumococcal disease in children: recommendations for using pneumococcal vaccine, Pediatr. Infect. Dis., 1985, **4**:343.

40. Giebink, G.S., The microbiology of otitis media, Pediatr. Infect. Dis. J., 1989, **8**:S18.

41. Gillespie, S.H., Aspects of pneumococcal infection including bacterial virulence, host response and vaccination, J. Med. Microbiol., 1989, **28**:237.

42. Gotschlich, E.C., Goldschneider, I., Lepow, M.L., Gold, R., The immune response to bacterial polysaccharides in man, In: Antibodies in human diagnosis and therapy, (Ed. Haber, E., Krause, R.M.) Raven, New York, 1977, 391—402.

43. Gray, B.M., Pneumococcal infection in a era of multiple antibiotic resistance, Adv. Ped. Inf. Dis. 1995; In press.

44. Haanes-Fritz, E., Kraus, W., Burdett, V., Dale, J.B., Beachey, E.H. and Cleary, P., Comparison of the leader sequences of four group A streptococcal M protein genes. Nucl. Acids. Res., 1988, **16**:4467—4677.

45. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, J. Mol. Biol. 1983, **166**:557—80.

46. Kauppi, M., Eskola, J., Kathty, H.H., Influence type b (Hib) conjugate vaccines induce mucosal IgA1 and IgA2 antibody responses in infants and chldren, ICAAC Abstracts 1993, **33**:174.

47. Kennedy, D., Derousse, C.E., Immunologic response of 12—18 month old children to licensed pneumococcal polysaccharide vaccine primed with *Streptococcus pneumoniae* 19 F conjugate vaccine, ICAAC 1994, 34th annual meetin, 236.

48. Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 1970, **227**:680—5.

49. Langermann, S., Palaszynski, S.R., Burlein, J.E., Koenig, S., Hanson, M.S., Briles, D.E., Stover, C.K., Protective humoral response against pneumococcal infection in mice elicited by recombinant Bacille Calmette-Guéin vaccines expressing PspA, J. Exp. Med. 1994, **180**:2277—2286.

50. Leinonen, M, A. Sakkinen, R. Kalliokoski, J. Luotenen, M. Timonen and P.H. Mekela, antibody response to 14-valent pneumococcal capsular polysaccharide vaccine in preschool agen children, Pediatr., Infect. Dis. 1986, **5**:39.

51. Lock, R.A., Patent, J.C., Hansman, D., Purification and immunologic characterization of neuraminidase produced by *Streptococcus pneumoninae*, Microbial Pathogenesis 1988, **4**:33—43.

52. Lock, R.A., Hansman, D., Paton, J.C., Comparative efficacy of autolysin and pneumolysin as immunogens protecting mice against infection by *Streptococcus pneumoniae*, Microbial Pathogenesis 1992, **12**:137—143.

53. Lock, R.A., Paton, J.c., Hansman, D., Comparative efficacy of pneumococcal neuraminidase and pneumolysin as immunogens protective against *Streptococcus pneumoniae*, Microb. Pathog. 1988, **5**:461—7.

54. Makela, P.H., M. Leinonen, J. Pukander and P. Karma, A study of the penumococcal vaccine in prevention of clinically acute attacks of recurrent otitis media, Rev. Infect., Dis. 1981, **3**:S124.

55. McCarty, M., In: The transforming principle, New York, Norton, 1985, 252.

56. McDaniel, L.S., Ralph, B.a., McDaniel, D.O., Briles, D.E., Localization of protection-eliciting epitopes on PspA of *Streptococcus pneumoniae* between amino acid residues 192 and 260, Microb. Pathog. 1994, **17**:323—337.

57. McDaniel, L.S., Scott, G., Widenhofer, K., Carroll, Briles, D.E., analysis of a surface protein of *Streptococcus pneumoniae* recognized by protective monoclonal antibodies, Microb. Pathog. 1986, **1**:519—531.

58. McDaniel, L.S., Brooks-Walter, A., Briles, D.E., Swiatlo, E., Oligonucleotides identify conserved and variable regions of *pspA* and *PspA*-like sequences of *Streptococcus pneumoniae*, Mol. Microbiol., Submitted.

59. McDaniel, L.S. and D.E. Briles, In: Monoclonal antibodies against bacteria, (Orlando, FL, Academic Press, Inc.), 1986, 143.

60. McDaniel, L.S., Yother, J., Vijayakumar, M., McGarry, L., Guild, W.R., Briles, D.E., Use of insertional inactivation to facilitate studies of biological properties of pneumococcal surface protein A (PspA), J. Exp. Med. 1987, **165**:381—394.

61. McDaniel, L.S., Sheffield, J.S., Delucchi, P., and Briles, D.E. (1991), PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type, Infect. Immun., **59**:222—228.

62. McDaniel, L.S., Scott, G., Kearney, J.F., Briles, D.E., Monoclonal antibodies against protease sensitive pneumococcal antigens can protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae*, J. Exp. Med. 1984, **160**:386—397.

63. McDaniel, L.S., McDaniel, D.O., In: Analysis of the gene encoding type 12 PspA of *S. pneumoniae* EP5668, (Ferretti J.J., Gilmore M.S., Klaenhammer T.R., Brown F. ed.), Genetics of Streptococci, Enterococci and Lactococci (Basel: Karger) 1995, 283—6.

64. McDaniel, L.S., Sheffield, J.S., Swiatlo, E., Yother, K., Crain, M.J. and Briles, D.E., Molecular localization of variable and conserved regions of *pspA*, and identification of additional *pspA*-homologous sequences in *Streptococcus pneumoniae*, Microbial Pathogenesis, 1992, **13**:261—269.

65. Meade, H.M., S.R. Long, C.B. Ruvkin, S.E. Brown and F.M. Ausubel, Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of Rhizobium melioti unduced by transposon Tn5 mutagenesis, J. Bacteriol 1982, **149**:114—122.

66. Meinkoth, J., and Wahl, G., Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports, Anal. Biochem. (1984), **138**:267—284.

67. Mond, J.J., Lees, A., Snapper, C.M., T cell-independent antigens type 2, Ann. Rev. Immunol. 1995, **13**:655—692.

68. Mufson, M.A., *Streptococcus pneumoniae*. In: Principles and Practice of Infectious Diseases, Mandell G.L., Douglas R.G., Jr., Bennett J.E., eds. (New York: Churchill Livingston) 1990, 1539—50.

69. Munoz, R., J.M. Musser, M. Crain, D.E. Briles, A. Marton, A.J. Parkinson, U. Sorensen and A. Tomasz, Geographic distribution of penicillin-resistent clones of *Streptococcus pneumoniae*: characterization by penicillin-binding protein profile, surface protein A typing, and multilocus enzyme analysis, Clinic. Infect. Dis. 1992, **15**:112—118.

70. Murray, M.G., and W.F. Thompson, Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, Nucl. Acids. Res. 1980, **8**:4321—4325.

71. Musher D.M., Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: Clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment, Clin. Infect. Dis., 1992, **14**:801.

72. Musher, D.M., Raizan, K.R., Weinstein, L., The effect of *Listeria monocytogenes* on resistance to pneumococcal infection, Soc. Exp. Bio. and Med., 1970, **135**:557—560.

73. Nordenstam, G., B. Anderson, D.E. Briles, J. Brooks, A. Oden, A. Svanborg and C.s. Eden, High antiphosphorylcholine antibody levels and mortality associated with pneumonia, Scand. J. Infect. Dis., 1990, **22**:187.

74. Osborn, M.J., Munson, J., Separation of the inner (cytoplasmic) and outer membranes of gram negative bacteria, Methods Enzymol., 1974, **31A**:642—653.

75. Paton, J.C., Pathogenesis of pneumococcal disease, 1993, 363—368.

76. Paton, J.C., Lock, R.a., Lee, C.-J., Li, J.P., Berry, A.M., Mitchell, Purification and immunogenicity of genetically obtained pneumolysin toxoids and their conjugation to *Streptococcus pneumoniae* type 19F polysaccharide, Infect. Immun. 1991, **59**:2297—2304.

77. Paton, J.C., Lock, R.a., Hansman, D.c., Effect of immunization with pneumolysin on survival time of mice challenged with *Streptococcus pneumoniae*, Infect. Immun. 1983, **40**:548—552.

78. Raven, A.W., Reciprocal capsular transformations of pneumococci, J. Bact. 1959, **77**:296—309.

79. Rijn, O.T., MacLeod, C.M., McCarty, M., Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types, Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III, J. Exp. Med. 1944, **79**:137—158.

80. Riley, I.D. and R.M. Douglas, an epidemiologic approach to pneumococcal disease, Rev. Infect. Dis., 1981, **3**:233.

81. Robbins, J.B., Austrian, R., Lee, C.-J., Rastogi, S.C., Schiffman, G., Henrichsen, J., Makela, P.H., Broome, C.V., Facklam, R.r., Tiesjema, R.H., Parke, J.C., Jr., Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups, J. Infect. Dis. 1983, **148**:1136—1159.

82. Roberts, P., Jeffery, P.K., Mitchell, T.J., Andrew, P.W., Boulnois, G.J., Feldman, C., Cole, P.J., Wilson, R., Effect of immunization with Freund's adjuvant and pneumolysin on histologic features of pneumococcal infection in the rat lung in vivo, Infect. Immun. 1992, **60**:4969—4972.

83. Sampson, J.S., O'Connor, S.P., Stinson, A.r., Tharpe, J.A., Russell, H., Cloning and nucleotide sequence analysis of *psaA*, the *Streptococcus pneumoniae* gene encoding a 37-kilodalton protein homologous to previously reported *Streptococcus* sp. adhesions, Infect. Immun. 1994, **62**:319—24.

84. Schneewind, O., Fowler, A., Faull, K.F., Structure of cell wall anchor of cell surface proteins in *Staphylococcus aureus*, Science 1995, **268**:103—106.

85. Schneewind O., Model, P., Fischetti, V.A., Sorting of protein a to the staphylococcal cell wall, Cell 1992, **70**:267—81.

86. Schwartz, B., Gove, S., Lob-Lovit, J., Kirkwood, B.R., Potential interactions for the prevention of childhood pneumonia in developing countries: etiology of accute lower respiratory infections among young children in developing countries, Ped. Infect. Dis., in Press.

87. Shapiro, E.D., Berg, A.T., Austrian, R., Schroeder, D., Parcella, V., Margolis, A., Adair, R.K., Clemmens, J.D., Protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine, N. Engl. J. Med., 1991, **325**:1453—1460.

88. Sheffield, J.S., W.H. Benjamin and L.S. McDaniel. Detection of DNA in Southern Blots by Chemiluminescence is a sensitive and rapid technique, Biotechniques 1992, **12**:836—839.

89. Shoemaker, N.B., Guild, W.r., Instruction of low efficiency markers in a slow process occurring at a heteroduplex stage of transformation, Mol. Gen. Genet. 1974, **128**:283—290.

90. Siber, G.R. Pneumococcal disease: prospects for a new generation of vaccines, Science 1994, **265**:1385—1387.

91. Sihavy, T.J., M.L. Berman and L.W. Enquist, In: Experiments with gene fusions, (Cold Spring Harbor: Cold Springs Harbor Laboratory), 1984.

92. Smith, P.K., I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Malia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson and D.C. Klenk, Measurement of Protein usin Bicinchoninic Acid, Anal Biochem 1985, **150**:76—85.

93. Smith, M.D., Guild, W.r. A plasmid in *Streptococcus pneumoniae*, J. Bacteriol. 1979, **137**:735—739.

94. Southern, E.M., Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, J. Mol. Biol. 1975, **98**:503—517.

95. Stein, K.E., Thymus-independent and thymus-dependent responses to polysaccharide antigens, J. Infect. Dis. 1992, **162**:S49.

96. Studier, F.W., Moffatt B.A., Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, J. Mol. Biol. 1986, **189**:113—30.

97. Talkington, D., Koenig, A., Russell, H., The 37 kDa protein of *Streptococcus pneumoniae* protects mice against fatal challenge, american Society of Microbiology Abstracts 1992, 149.

98. Talkington, D.f., Voellinger, D.C., McDaniel, L.s., Briles, D.e., Analysis of pneumococcal PspA microheterogeneity in SDS polyacrylamide gels and the association of PspA with the cell membrane, Microb. Pathog. 1992, **13**:343—355.

99. Talkington, D.F., Crimmins, D.L., Voellinger, D.C., Jother, J., Briles, D.e., A 43-kilodalton pneumococcal surface protein, PspA: isolation, protective abilities, and structural analysis of the amino-terminal sequence, Infect. 1991. **59**:1285—1289.

100. Tart, R.C., McDaniel, L.S., Ralph, B.a., Briles, D.E., Truncated *Streptococcus pneumoniae* PspA molecules elicit cross-protective immunity against oneumococcal challenge in mice, J. Infect. Dis. 1995, In Press.

101. Tomasz, A. Surface components of *Streptococcus pneumoniae*. Rev. Infect. Dis. 1981, **3**:190—211.

102. Tomasz, A. Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of pneumococcus: chain formation, loss of transformability, and loss of autolysis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1968, **59**:86—93.

103. Towbin H, Staehelin T, Gordon J., electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, PNAS 1979, **76**:4350—4.

104. Tuomanen, E., Liu, H., Hengstler, B., Zak, O., Tomasz, A., The Induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. 1985, **151**:859—868.

105. Tuomanen, E., Tomasz, A., Hengstler, B., Zak, O., The relative role of bacterial cell wall and capsule in the induction of inflammation in pneumococcal meningitis, j. Infect., Dis. 1985, **151**:535—540.

106. van de Rijn, I., Kessler, R.E., Groth characteristics of Group A Streptococci in a new chemically defined medium, Infect. Immun. 1980, **27**:444—448.

107. Waltman, W.d. II, McDaniel, L.s., Gray, B.M., and Briles, D.e., Variation in the molecular weight of PspA (pneumococcal surface protein A) among *Streptococcus pneumoniae*, Microbial Pathogenesis 1990, **8**:61—69.

108. Waltman, W.D., II, McDaniel, L.s., Andersson, B., Bland, L., Gray, B.M., Svanborg-Eden, C., Briles, D.E., Protein serotyping of *Streptococcus pneumoniae* based on reactivity to six monoclonal antibodies, Microb. Pathog. 1988, **5**:159—167.

109. Weigle, W.O. Immunological unresponsiveness In: Adv. Immunol., (Ed. Dixon, J.F., Kunkel, H.G.) Academic Press, New York, 1973, 61—162.

110. Wicker L.S. and I. Scher, X-linked immune deficiency (Xid) of CBA/N mice, New York,: Apringer-Verlag, 1986, 86.

111. Wrigh P.F., S.H. Sell, W.K. Vaughn, C. Andrews, K.B. McConnell and G. Schiffman, Clinical studies of penumococcal vaccines in infants, II, Efficacy and effect on nasopharyngeal carriage, Rev. Infect. Dis. 1981, **3**:S108.

112. Yother, J., McDaniel, L.S., Crain, M.J., Talkington, D.f., Briles, D.E., Pneumococcal surface protein A: Structural analysis and biological significance In: Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci, and Enterococci, (ed. Dunny, G.M.; Cleary, P.P., McKay, L.L.) American Society for Microbiology, Washington, DC, 1991, 88—91.

113. Yother, J. and D.r. Briles, Structural properties and evolutionary relationships of PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, as revealed by sequence analysis, J. Bact. 1992, **174**:601—609.

114. Yother, J., McDaniel, L.s., and Briles, D.E., Transformation of encapsulated *Streptococcus pneumoniae*, J. Bacteriol. 1986, **168**:1463—1465.

115. Yother, J, White JM. Novel surface attachment mechanism for the streptococcus pneumoniar protein PspA, J. Bact. 1994, **176**:2976—85.

116. Yother, J., Handsome, G.L., Briles, D.E. Truncated forms of PspA that are secreted from *Streptococcus pneumoniae* and their use in functional studies and cloning of the *pspA* gene, J. Bact., 1992, **174**:610—618.

117. Yother J, Forman C, Gray BM, Briles DE. Protection of mice from infection with *Streptococcus pneumoniae* by anti-phosphocholine antibody, Infect. Immun. 1982, **36**:184—8.

118. Zar J.H., Biostatistical Analysis, 2nd Ed., Englewood Cliffs, NJ, Prentice-Hall, Inc., 1984, 718.

Patenttivaatimukset

1. Eristetty nukleiinihappomolekyyli, **tunnettu** siitä, että se koodaa *Streptococcus pneumoniaen* pneumokokkipintaproteiinin (PspC) geenin tai epitoopin.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen eristetty nukleiinihappomolekyyli, **tunnettu** siitä, että nukleiinihappomolekyyli koodaa kuvioissa 21 A – E esitetyn aminohapposekvenssin.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen eristetty nukleiinihappomolekyyli, **tunnettu** siitä, että nukleiinihappomolekyyli koodaa kuvioissa 21 A – E esitetyn aminohapposekvenssin, joka alkaa asemassa -37 olevasta aminohappotähteestä ja päättyy asemassa 892 olevaan aminohappotähteeseen.

4. Patenttivaatimuksen 2 mukainen eristetty nukleiinihappomolekyyli, **tunnettu** siitä, että nukleiinihappomolekyyli koodaa kuvioissa 21 A – E esitetyn aminohapposekvenssin, joka alkaa asemassa 1 olevasta aminohappotähteestä ja päättyy asemassa 892 olevaan aminohappotähteeseen.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen eristetty nukleiinihappomolekyyli, **tunnettu** siitä, että nukleiinihappomolekyylillä on kuvioissa 21 A – E esitetty nukleotidisekvenssi.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen eristetty nukleiinihappomolekyyli, **tunnettu** siitä, että nukleiinihappomolekyylillä on kuvioissa 21 A – E esitetty nukleotidisekvenssi, joka alkaa asemassa 1 olevasta nukleotidistä ja päättyy asemassa 3108 olevaan nukleotidiin.

7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen eristetty nukleiinihappomolekyyli, **tunnettu** siitä, että nukleiinihappomolekyylillä on kuvioissa 21 A – E esitetty nukleotidisekvenssi, joka alkaa asemassa 431 olevasta nukleotidistä ja päättyy asemassa

3108 olevaan nukleotidiin.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen eristetty nukleiinihappomolekyyli, **tunnettu** siitä, että nukleiinihappomolekyyli koodaa kuvioissa 25 A – C esitetyn nukleotidisekvenssin koodaaman aminohapposekvenssin.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen eristetty nukleiinihappomolekyyli, **tunnettu** siitä, että nukleiinihappomolekyyli käsittää kuvioissa 25 A – C esitetyn nukleotidisekvenssin.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen eristetty nukleiinihappomolekyyli, **tunnettu** siitä, että nukleiinihappomolekyyli hybridisoituu kuvioissa 21 A – E esitetyn nukleiinihappomolekyylin kanssa sitoutumisolosuhteissa käsittäen:

hybridisoimisen 42 °C:ssa 18 h ajan 45-%:isessa formamidissa, 5x SSC:ssä ja

pesemisen 0,1-%:isessa SDS:ssä ja 2x SSC:ssä 3 min ajan huoneenlämpötilassa.

11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen eristetty nukleiinihappomolekyyli, **tunnettu** siitä, että se koodaa *S. pneumoniaen* pneumokokkipintaproteiinia (PspC), jossa on alfa-kierteiset, runsaasti proliinia sisältävät toistojaksoalueet.

12. Vektori tai plasmidi, **tunnettu** siitä, että se käsittää patenttivaatimuksen 1 mukaisen eristetyn nukleiinihappomolekyylin.

13. Isäntäsolu, **tunnettu** siitä, että sille on aikaansaatu transduktio tai transformaatio patenttivaatimuksen 1 mukaisella eristetyllä nukleiinihappomolekyylillä.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen isäntäsolu, **tunnettu** siitä, että isäntäsolu on bakteerisolu, virus, hiivasolu tai nisäkässolu.

15. Immunologinen koostumus, **tunnettu** siitä, että se käsittää patenttivaatimuksen 1 mukaista eristettyä nukleiinihappomolekyyliä.

16. Eristetty pneumokokkipintaproteiini (PspC) tai sen epitooppiset alueet.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen proteiini, **tunnettu** siitä, että proteiinilla on kuvioissa 21 A – E esitetty aminohapposekvenssi.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen proteiini, **tunnettu** siitä, että proteiinilla on kuvioissa 21 A – E esitetty aminohapposekvenssi, joka alkaa asemassa -37 olevasta aminohappotähteestä ja päättyy asemassa 892 olevaan aminohappotähteeseen.

19. Patenttivaatimuksen 17 mukainen proteiini, **tunnettu** siitä, että proteiinilla on kuvioissa 21 A – E esitetty aminohapposekvenssi, joka alkaa asemassa 1 olevasta aminohappotähteestä ja päättyy asemassa 892 olevaan aminohappotähteeseen.

20. Patenttivaatimuksen 16 mukainen proteiini, **tunnettu** siitä, että proteiini on alfa-kierrealueen kiertynyt motiivi.

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen proteiini, **tunnettu** siitä, että proteiinin aminohapposekvenssi on valittu kuviossa 23 A, kuviossa 23 B, kuviossa 23 C, kuviossa 23 D ja kuviossa 23 E esitettyjen aminohapposekvenssien joukosta.

22. Patenttivaatimuksen 21 mukainen proteiini, **tunnettu** siitä, että proteiinilla on kuviossa 23 A esitetty aminohapposekvenssi.

23. Patenttivaatimuksen 21 mukainen proteiini, **tunnettu** siitä, että proteiinilla on kuviossa 23 B esitetty aminohapposekvenssi.

24. Patenttivaatimuksen 21 mukainen proteiini, **tunnettu** siitä, että proteiinilla on kuviossa 23 C esitetty aminohapposekvenssi.

25. Patenttivaatimuksen 21 mukainen proteiini, **tunnettu** siitä, että proteiinilla on kuviossa 23 D esitetty aminohapposekvenssi.

26. Patenttivaatimuksen 21 mukainen proteiini, **tunnettu** siitä, että proteiinilla on kuviossa 23 E esitetty aminohapposekvenssi.

27. Patenttivaatimuksen 16 mukainen proteiini, **tunnettu** siitä, että proteiini on alfa-kierrealueen ei-kiertynyt motiivi.

28. Patenttivaatimuksen 27 mukainen proteiini, **tunnettu** siitä, että proteiinilla on aminohapposekvenssi, joka on valittu kuviossa 23 A, kuviossa 23 B, kuviossa 23 C, kuviossa 23 D ja kuviossa 23 E esitettyjen aminohapposekvenssien joukosta.

29. Patenttivaatimuksen 28 mukainen proteiini, **tunnettu** siitä, että proteiinilla on kuviossa 23 A esitetty aminohapposekvenssi.

30. Patenttivaatimuksen 28 mukainen proteiini, **tunnettu** siitä, että proteiinilla on kuviossa 23 B esitetty aminohapposekvenssi.

31. Patenttivaatimuksen 28 mukainen proteiini, **tunnettu** siitä, että proteiinilla on kuviossa 23 C esitetty aminohapposekvenssi.

32. Patenttivaatimuksen 28 mukainen proteiini, **tunnettu** siitä, että proteiinilla on kuviossa 23 D esitetty aminohapposekvenssi.

33. Patenttivaatimuksen 28 mukainen proteiini, **tunnettu** siitä, että proteiinilla on kuviossa 23 E esitetty aminohapposekvenssi.

34. Immunologinen koostumus, **tunnettu** siitä, että se käsittää vähintään kahta erilaista täysipituista eristettyä PspA:ta.

35. Immunologinen koostumus, **tunnettu** siitä, että se käsittää vähintään kahta erilaista eristettyä PspA:ta.

36. Patenttivaatimuksen 35 mukainen immunologinen koostumus, **tunnettu** siitä, että nämä kaksi PspA:ta ovat restriktiofragmenttipolymorfismianalyysin perusteella eri ryhmistä.

Patentkrav

1. Isolerad aminosyramolekyl, som består av resterna 1—115, 1—260, 192—588, 192—299 eller resterna 192—260 av pneumokockytprotein A av *Streptococcus pneumoniae*.

2. Isolerad DNA-molekyl, som består av ett fragment av en pneumokockytprotein A gen av *Streptococcus pneumoniae*, som kodar den isolerade aminosyramolekylen enligt patentkrav 1.

3. PCR-primer som väsentligen består den isolerade DNA-molekylen enligt patentkrav 2.

4. Hybridiseringsprob, som väsentligen består av den isolerade DNA-molekylen enligt patentkrav 2.

5. Immunologisk sammansättning, som innefattar aminosyramolekylen enligt patentkrav 1.

6. Isolerad DNA-molekyl, som består av nukleotiderna 1—26, 1967—1990, 161—187, 1093—1117 eller 1312—1331 eller 1333—1355 av en pneumokockytprotein A gen av *Streptococcus pneumoniae*.

7. PCR-primer som väsentligen består den isolerade DNA-molekylen enligt patentkrav 6.

8. Hybridiseringsprob, som väsentligen består av den isolerade DNA-molekylen enligt patentkrav 6.

9. Isolerad DNA-molekyl, som består av ett fragment av en pneumokockytprotein A gen av *Streptococcus pneumoniae*, vilket fragment består av en nukleotidsekvens (5'—3'), som är vald från följande:

CCGGATCCAGCTCCTGCACCAAAAAC;
GCGCGTCGACGGCTTAAACCCATTCACCATTGG;
CCGGATCCGCAAAGAGATTGATGAGTCTG;
GCGGATCCCTAGCCAGTCAGTCTAAAGCTG;
CTGAGTCGACTGGAGTTTCTGGAGCTGGAGC;
CCGGATCCAGCTCCAGCTCCAGAAACTCCAG;
GCGGATCCTTGACCAATATTTACGGAGGAGGC;
GTTTTTGGTGCAGGAGCTGG;
GCTATGGGCTACAGGTTG;
CCACCTGTAGCCATAGC;
CCGCATCCAGCGTGCCTATCTTAGGGGCTGGTT; och
GCAAGCTTATGATATAGAAATTTGTAAC.

10. PCR-primer som väsentligen består av åtminstone en isolerad DNA-molekyl enligt patentkrav 9.

11. Hybridiseringsprob, som väsentligen består av åtminstone en isolerad DNA-molekyl enligt patentkrav 9.

12. PCR-prob(er), som kan skilja mellan *pspA*- och *pspA*-liknande nukleotids-ekvenser.

13. PCR-prob(er), som hybridiseras med både *pspA*- och *pspA*-liknande nukleotids-ekvenser.

14. PspA-extrakt, som är framställt med en process, som innefattar att man:

låter pneumokocker tillväxa i ett första medium, som innehåller kolinklorid,

eluerar levande pneumokocker med en saltlösning, som innehåller kolinklorid , och

låter pneumokockerna leva i ett andra medium, som innehåller en alkanolamin och väsentlige inget kolin alls.

15. PspA-extrakt, som är framställt genom att man:

låter pneumokocker tillväxa i ett första medium, som innehåller kolinklorid,

eluerar levande pneumokocker med en saltlösning, som innehåller kolinklorid, och

låter pneumokockerna leva i ett andra medium, som innehåller en alkanolamin och väsentligen inget kolin alls, och rengör PspA genom isolering med hjälp av en kolin-Sepharose-affinitetskolonn.

16. Immunologisk sammansättning, som innefattar extraktet enligt patnetkrav 14.

17. Immunologisk sammansättning, som innefattar extraktet enligt patentkrav 15.

18. Immunologisk sammansättning, som innefattar PspA av full längd.

19. Förfarande för att förbättra immunogeniteten av en immunologisk sammansättning som innehåller PspA, vilket innefattar att man i nämnda sammansättning inkludersr C-änddelen av PspA.

20. Immunologisk sammansättning, som innefattar åtminstone två PspA:er.

21. Immunologisk sammansättning enligt patentkrav 20, k ä n n e t e c k n a d därav, att PspA:erna härrör från olika grupper utgående från RFLP.

22. PCR-amplifieringsprodukt från en primer enligt patnetkraven 3, 7, 10 eller 13.

23. Isolerad DNA-molekyl, som består av en nukleotidsekvens, som är homolog med en del av pspA.

24. Isolerad aminosyramolekyl, som innefattar pneumokockytprotein C, PspC, av *Streptococcus pneumoniae*, som har alfa-spiralvridna, prolinrika och upprepade områden.

25. Isolerad DNA-molekyl, som innefattar en gen av *S. pneumoniae* som kodar pneumokockytprotein C, som kodar den isolerasde aminosyramolekylen enligt patnetkrav 24.

26. PCR-primer, som väsentligen består av den isolerade DNA-molekylen enligt patentkrav 25.

27. Hybridiseringsprob, som väsentligen består av den isolerade DNA-molekylen enligt patentkrav 25.

28. Immunologisk sammansättning, som består av aminosyran enligt patentkrav 24.

29. Isolerad aminosyramolekyl enligt patnetkrav 24 som har en stark homologi med pneumokockytprotein A, PspA, eller *S. pneumoniae* från och med aminosyran 458 av PspC, som motsvarar aminosyran 147 av PspA, och till och med C-ändan av PspC och PspA.

30. Isolerad aminosyramolekyl enligt patentkrav 24, som vidare innefattar en signalsekvens, som väsentligen består av ett laddat område följt av ett hydrofobiskt skal av aminosyror.

31. Isolerad aminosyramolekyl enligt patnetkrav 24, k ä n n e t e c k n a d därav, att det alfa-spiralformiga området vidare innefattar perioder av sju rester och ett vridet spolformigt område med tre avbrott som upprepar sig inom sträckor på sju.

32. Isolerad aminosyramolekyl, som innefattar pneumokockytprotein C, PspC eller *S. pneumoniae* med alfa-spiralformiga, prolinrika och upprepade områden, där det

alfa-spiralformiga området innefattar en C-ända med väsentlig homologi med ett område av PspA som ger skydd.

33. Isolerad DNA-molekyl, som innefattar ett en gen av *S. pneumoniae* som kodar pneumokockytprotein C, som kodar den isolerasde aminosyramolekylen enligt patentkrav 32.

34. PCR-primer, som väsentligen består av den isolerade DNA-molekylen enligt patentkrav 33.

35. Hybridiseringsprob, som väsentligen består av den isolerade DNA-molekylen enligt patentkrav 33.

36. Immunologisk sammansättning, som innefattar aminosyramolekylen enligt patentkrav 32.

37. Isolerad aminosyramolekyl enligt patentkrav 24, som vidare innefattar en delvis hydrofob svans på 17 aminosyror.

38. Isolerad aminosyramolekyl enligt patentkrav 32, som vidare innefattar en delvis hydrofob svans på 17 aminosyror.

39. Isolerad aminosyramolekyl enligt patentkrav 24, som vidare innefattar en epitop av intresse.

40. Isolerad aminosyramolekyl enligt patentkrav 32, som vidare innefattar en epitop av intresse.

41. Immunologisk sammansättning, som innefattar aminosyramolekylen enligt patentkrav 39.

42. Immunologisk sammansättning, som innefattar aminosyramolekylen enligt patentkrav 40.

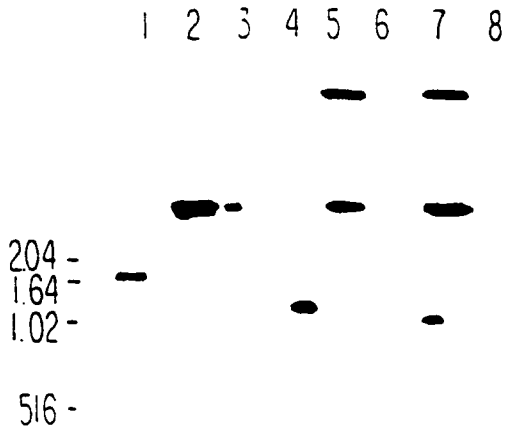


FIG. 1A

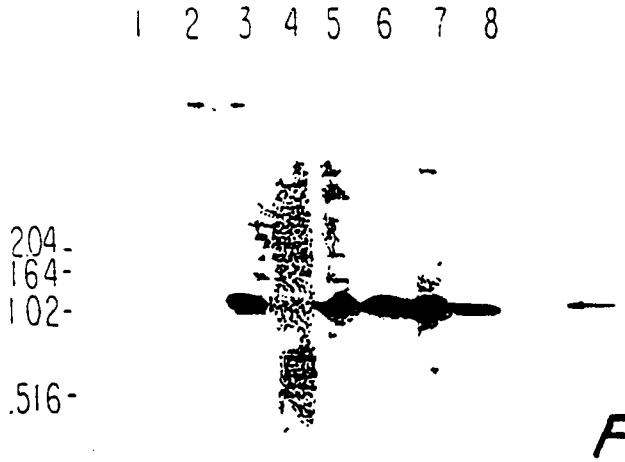


FIG. 1B

FIG. 2

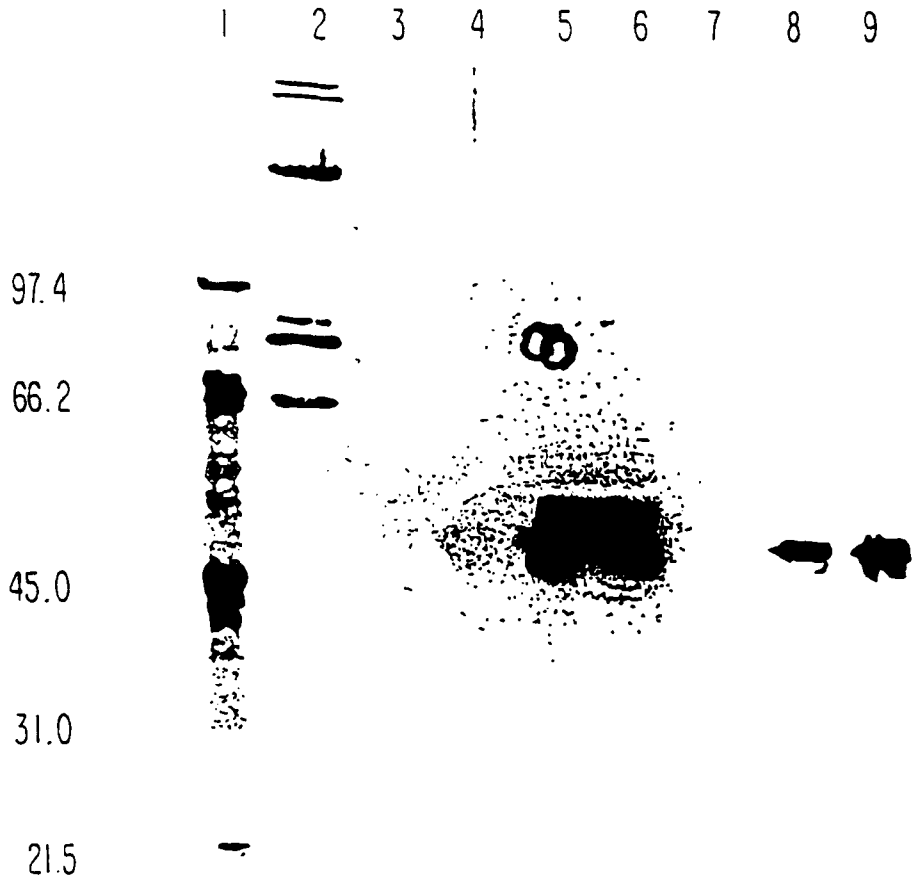
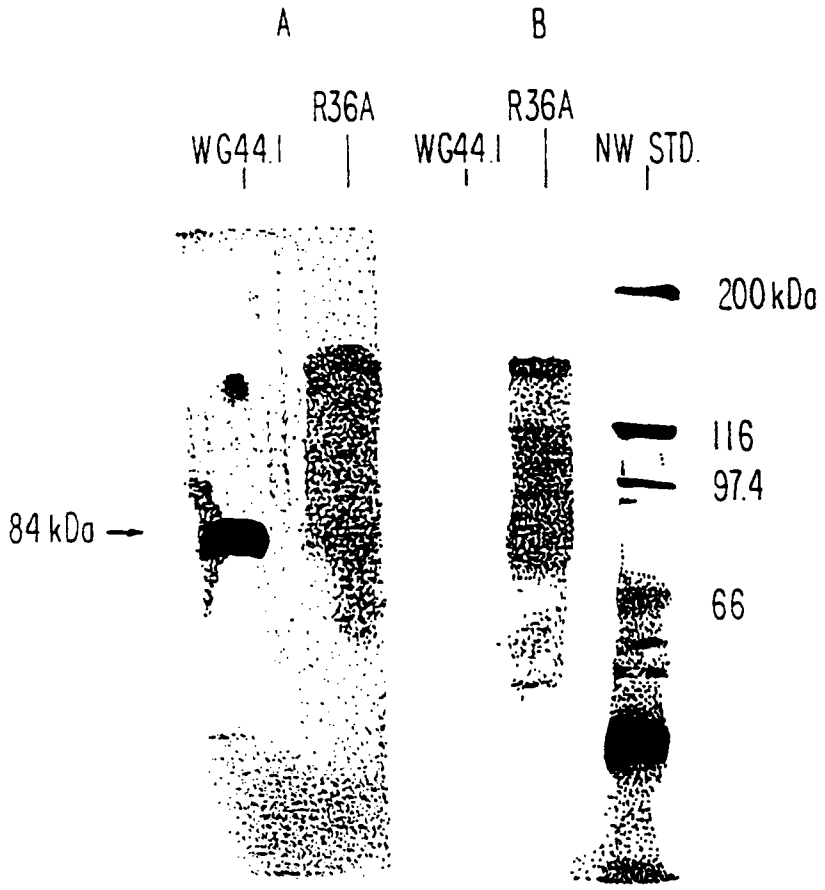


FIG. 3



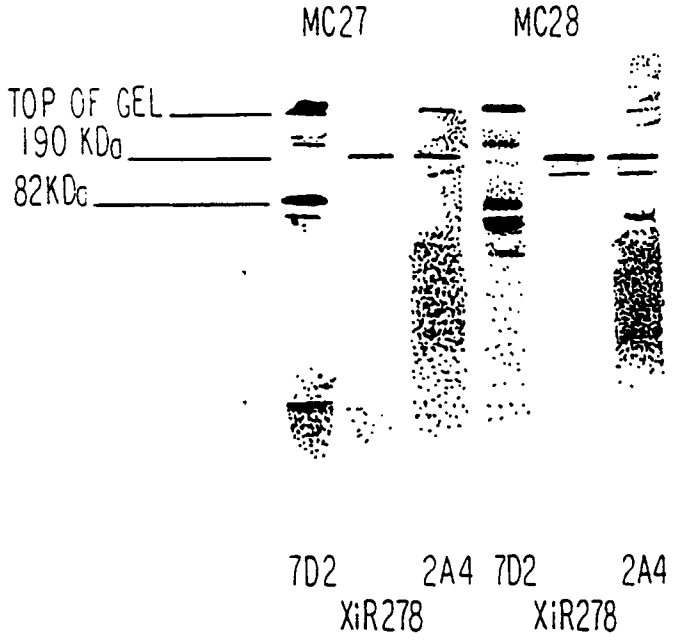

MC27
MC28
TOP OF GEL
190 KDa
82KDa
7D2
2A4
7D2
2A4
XiR278
XiR278

FIG. 4

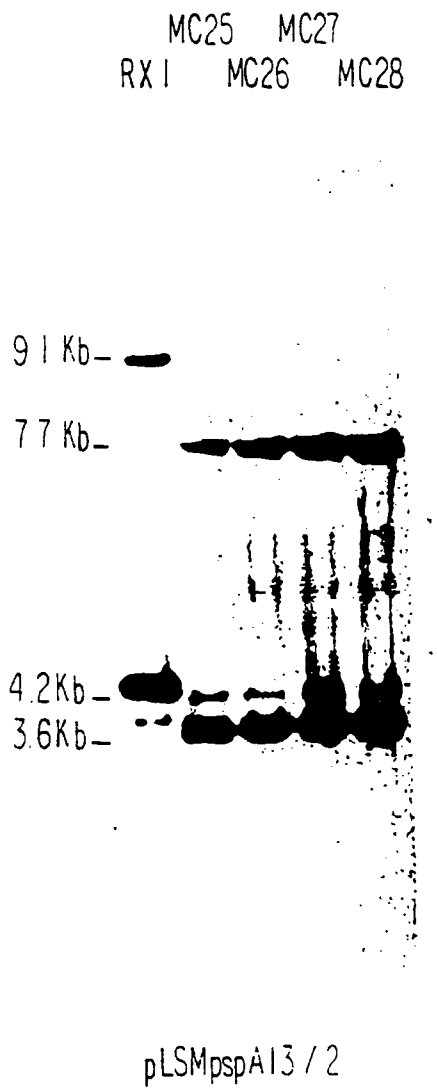

MC25 MC27
RXI MC26 MC28
9.1 Kb
7.7 Kb
4.2Kb
3.6Kb
pLSMpspA13 / 2

FIG. 5A

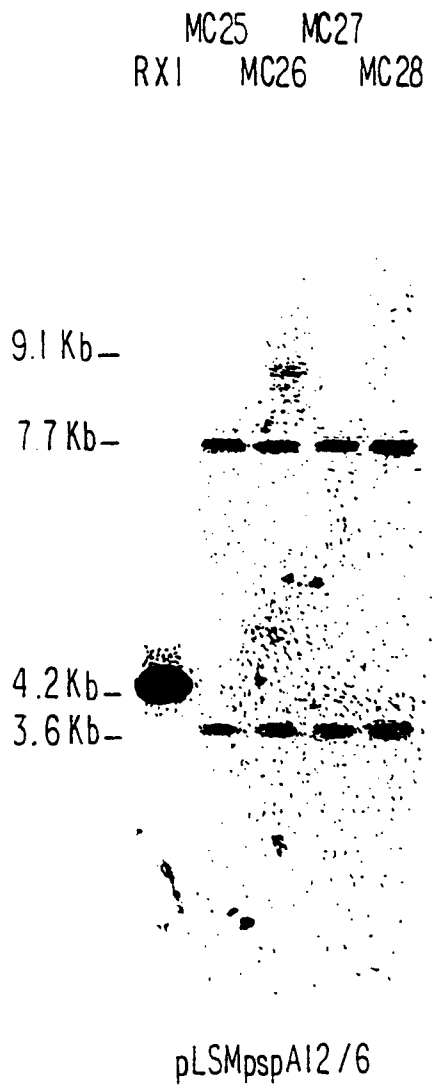

MC25 MC27
RXI MC26 MC28
9.1 Kb
7.7 Kb
4.2Kb
3.6Kb
pLSMpspA12 / 6

FIG. 5B

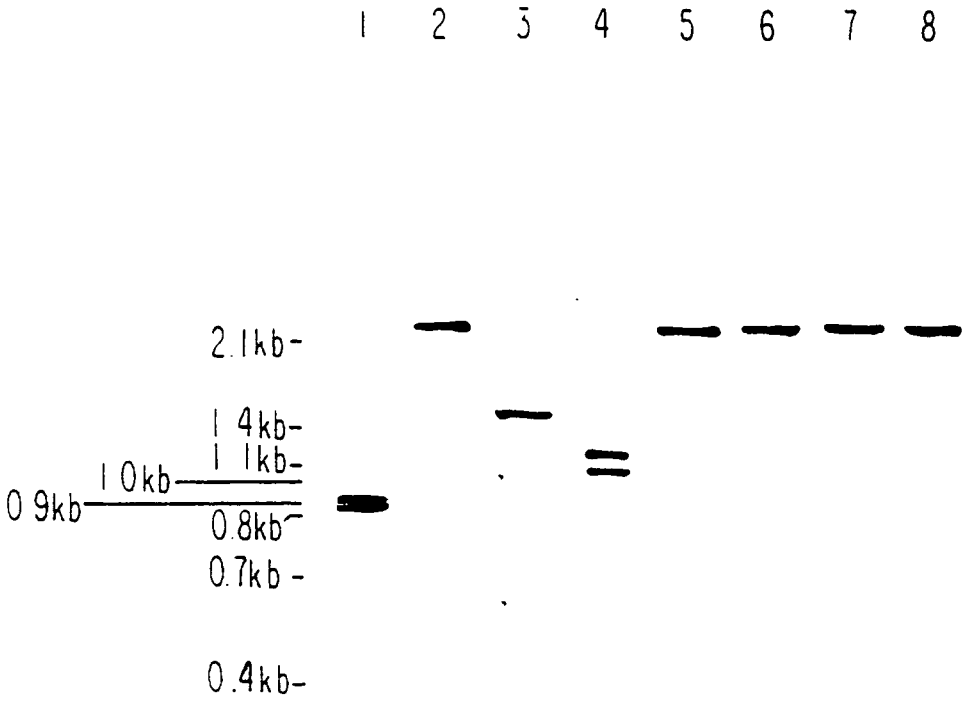


FIG. 6

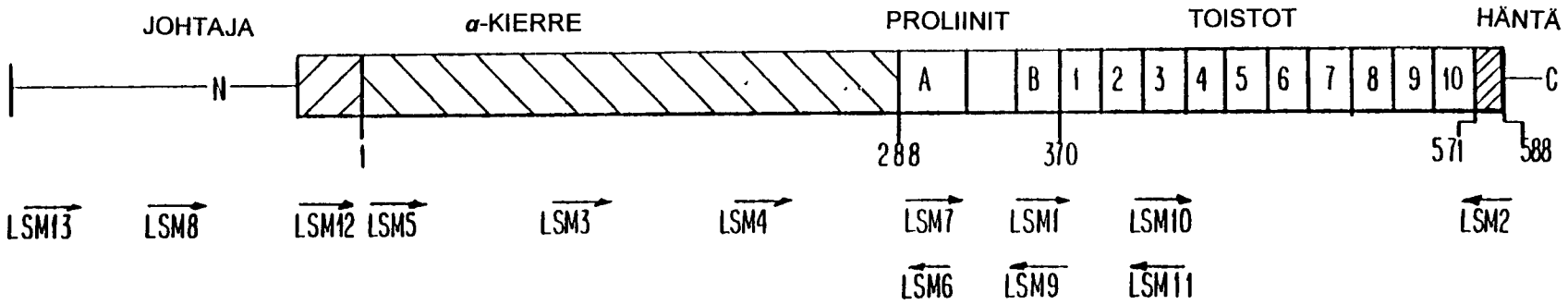

JOHTAJA
α-KIERRE
PROLIINIT
TOISTOT
HÄNTÄ
N
A
B
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
C
1
288
370
571
588
LSM13
LSM8
LSM12
LSM5
LSM3
LSM4
LSM7
LSM1
LSM10
LSM2
LSM6
LSM9
LSM11

FIG.7

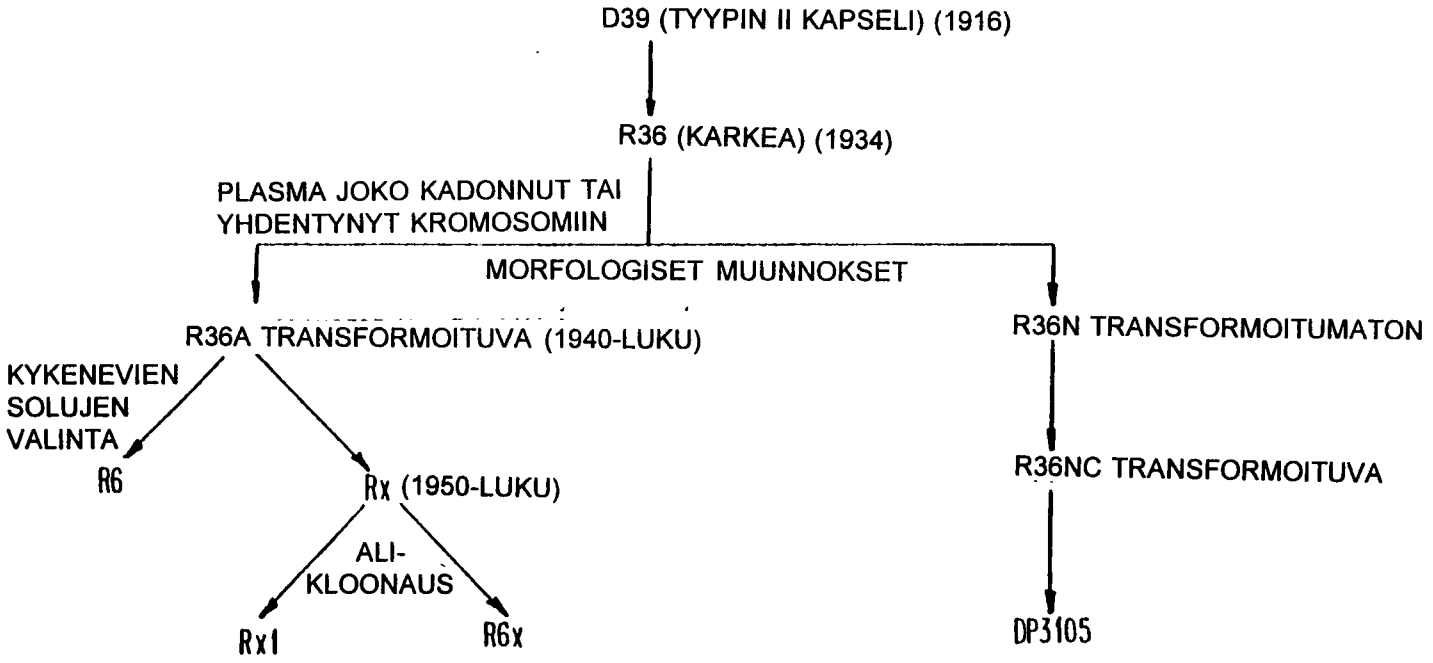

D39 (TYYPIN II KAPSELI) (1916)
R36 (KARKEA) (1934)
PLASMA JOKO KADONNUT TAI
YHDENTYNYT KROMOSOMIIN
MORFOLOGISET MUUNNOKSET
R36A TRANSFORMOITUVA (1940-LUKU)
R36N TRANSFORMOITUMATON
KYKENEVIEN
SOLUJEN
VALINTA
R6
Rx (1950-LUKU)
ALI-
KLOONAUS
Rx1
R6x
R36NC TRANSFORMOITUVA
DP3105

FIG.8

FIG. 9

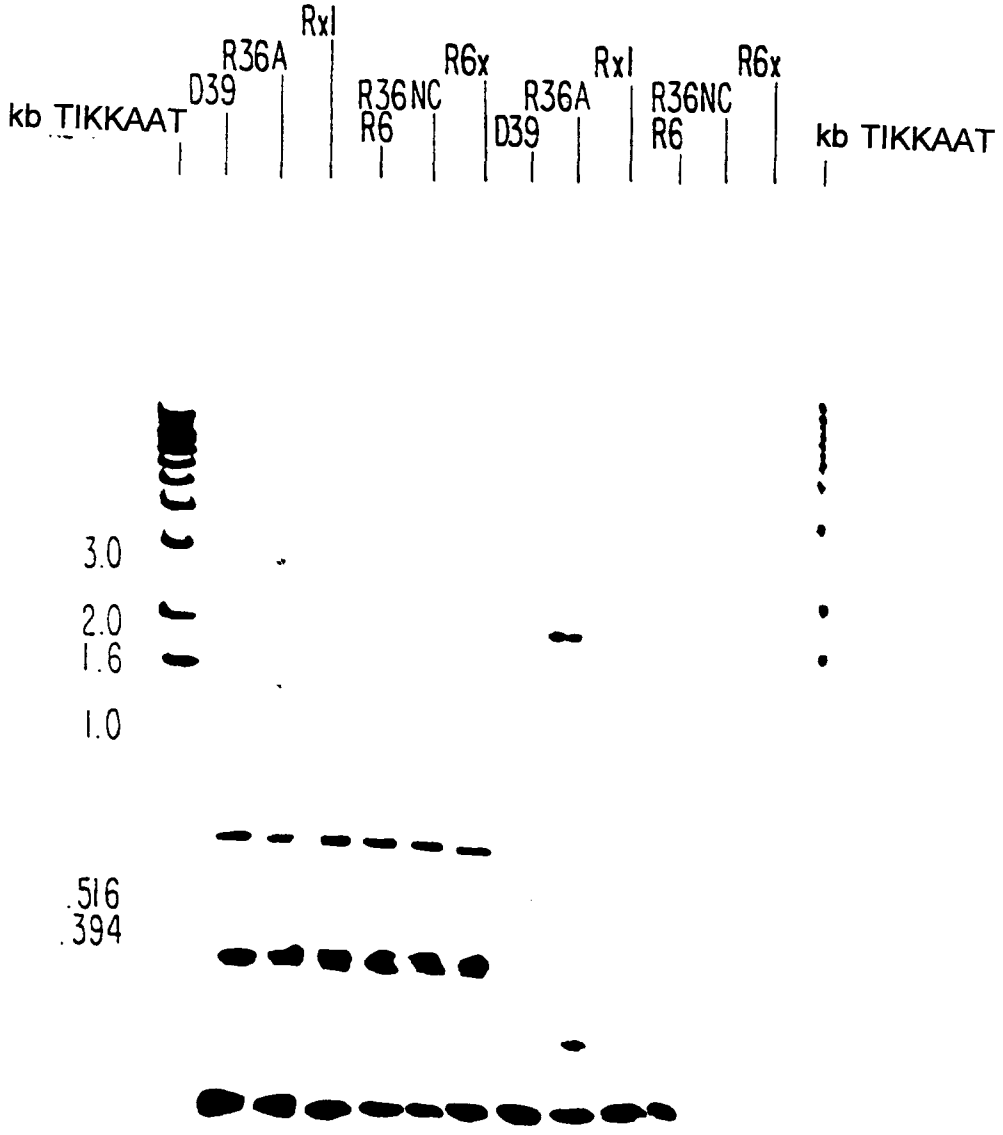

kb TIKKAAT
D39
R36A
RxI
R36NC
R6
R6x
D39
R36A
RxI
R36NC
R6
R6x
kb TIKKAAT
3.0
2.0
1.6
1.0
.516
.394

FIG. 10

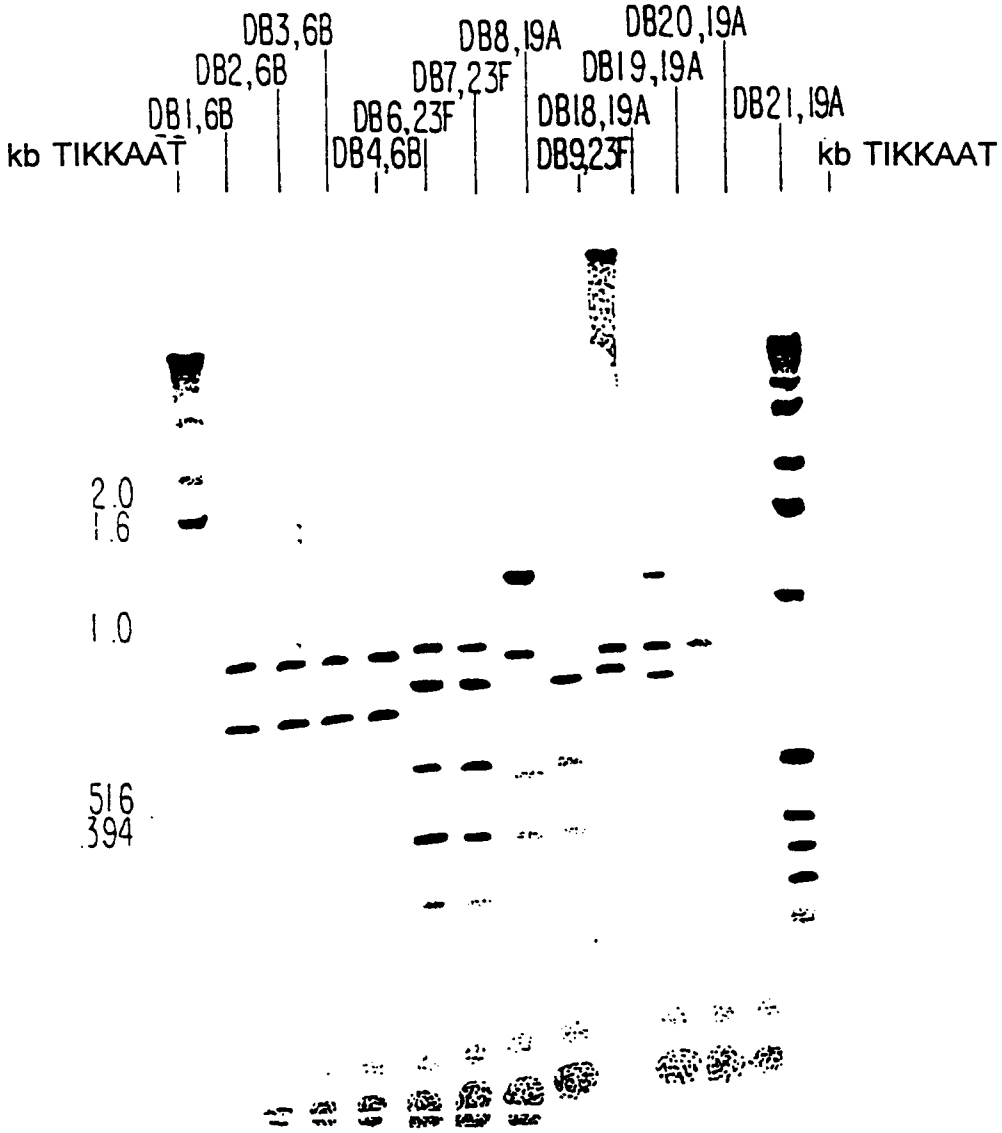

DB3,6B
DB2,6B
DB1,6B
kb TIKKAAT
DB6,23F
DB4,6B
DB7,23F
DB8,19A
DB18,19A
DB9,23F
DB20,19A
DB19,19A
DB21,19A
kb TIKKAAT
2.0
1.6
1.0
516
394

FIG. 11

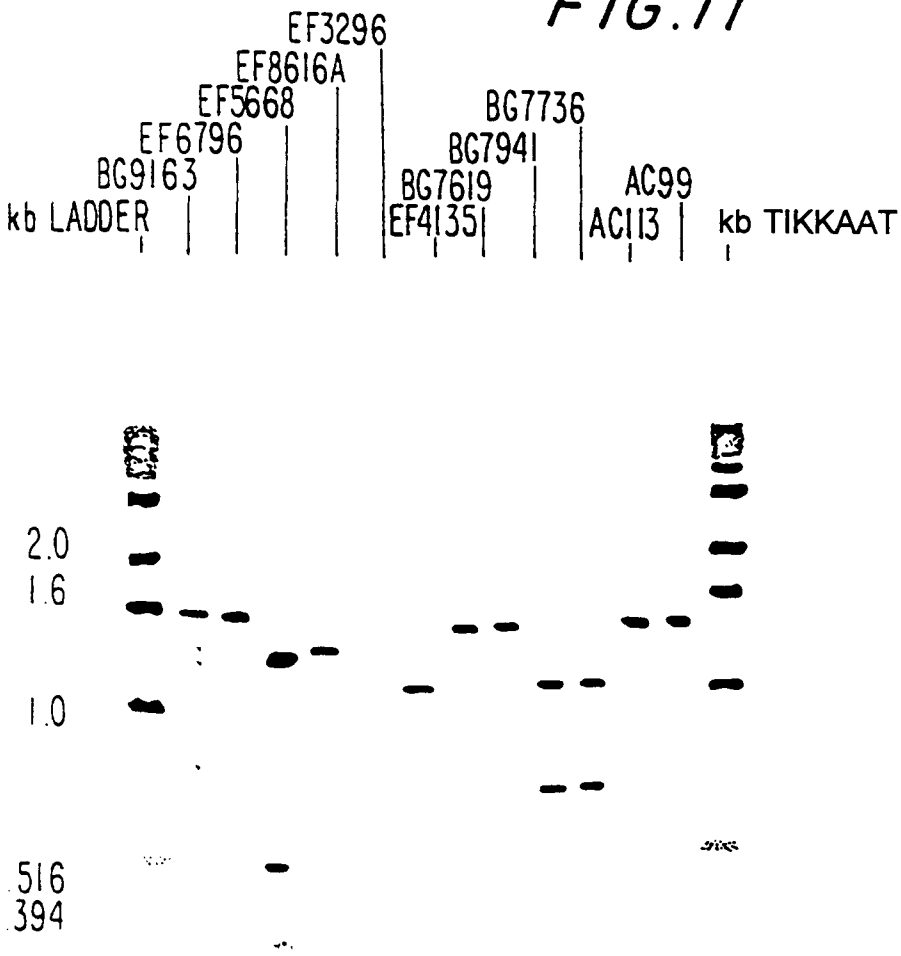
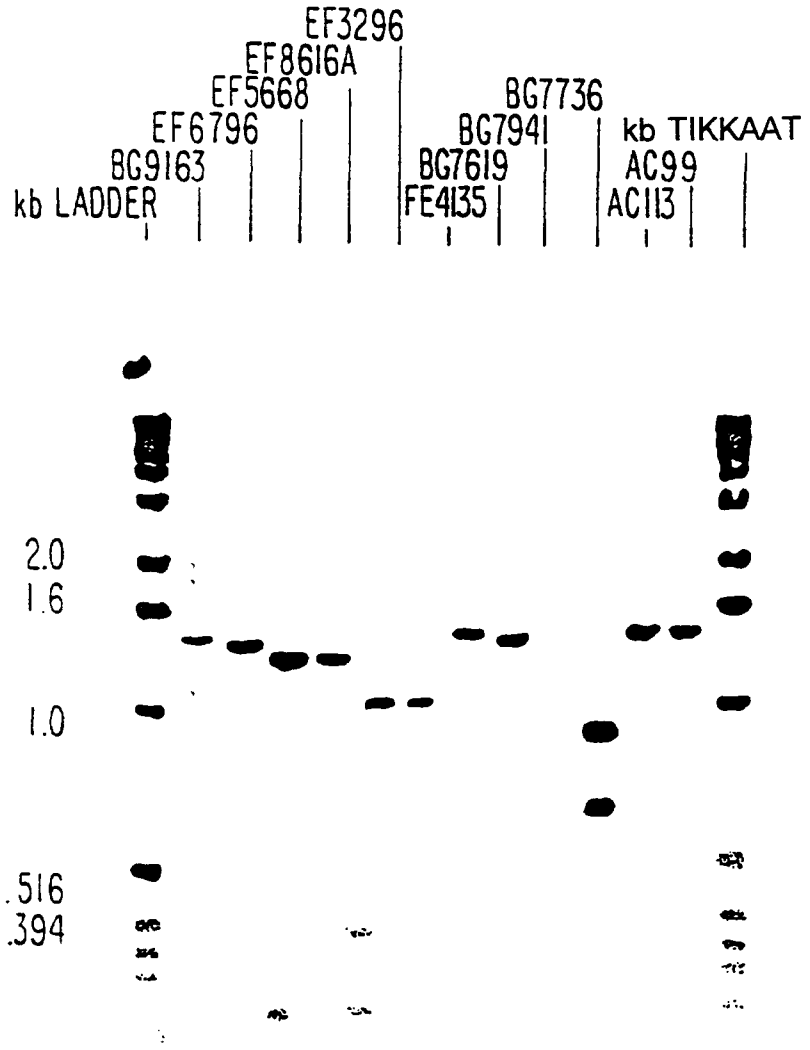

EF3296
EF8616A
EF5668
EF6796
BG9163
kb LADDER
BG7736
BG7941
BG7619
EF4135
AC99
AC113
kb TIKKAAT
2.0
1.6
1.0
516
394

FIG. 12


EF3296
EF8616A
EF5668
EF6796
BG9163
kb LADDER
BG7736
BG7941
BG7619
FE4135
kb TIKKAAT
AC99
AC113
2.0
1.6
1.0
.516
.394

AMINOHAPPOSEKVENSSIT ERI PSPA-GEENIEN NH2-PÄÄTTEESSÄ. Väli istutettu, jotta samankaltaiset PspA-sekvenssit saataisiin vastaamaan mahdollisimman hyvin toisiaan).

```
ATCC6303      MNKKKMILTS LASVAILGTG FVASPPTLVR AEESPQVVEK SSLEKKYEEA
              KAKADTAKKD YETAKK...K AEDAQKKYDE DQKKTEDKAK A.VKKVDEER
              QKAILAVQKA YVEY....RE AKDKASAEKQ IAEAKRKT.. ..........
              .......... .......... .......... .......... ..........
              .......... ..........
Ac94...       MNKKKMILTS LASVAILGAG LVTAQPTLVR AEEAP.VASQ SKAEKDYDTA
              KRDAENAKKA LEEAKR.... ...AQKKYED DQKKTEEKAK E.EKQASEAE
              QKANLQYQLK LREYIQ..KT GDRSKIQTEM EEAEKKHKTA KAEFDKVRGT
              VIPSAARV.. .......... .......... .......... ..........
              .......... ..........
Bg11703pro    MNKKKMILTS LASVAILGAG LVTSQPTLVR AEEAP.VASQ SKAEKDYDAA
              VKKSEAAKKA YEEAKK...K AEDAQKKYDE DQKKTEEKA. ENEKKAAADL
              TEATEVHQKA YVRYSGSNEQ KIKNFKILAI .......... ..........
              .......... .......... .......... .......... ..........
              .......... ..........
Bg7322pro     MXKKKMILTS LASVAILGAG XVASQPTKVR AEDAP.VANQ SQAEKDYXAA
              XXKSEAAKKX YXXAKKVLAE AEAAQKXXED XQKKPEEKA. EKAKAASEEI
              VKATEEVQXA A......... .......... .......... ..........
              .......... .......... .......... .......... ..........
              .......... ..........
```

FIG. 13A

```
Bg7561pro    MNKKKMILTS LASVAILGAG LVTSQPTLVR AEEAP.GASQ SKAEKDYXAA
             XKKSEAAKKA YEEAKK...K AEDAQKKYDE GQKKTEEKA. RKAEEASKEL
             AKATSEVQNA YVKYQGVQRN SRLNEKERKK QLAEIDEEIN KAKQIWNEKN
             EDFKKVREEV IPEPTELAKD QRKAEEAKAE EKVAKRKYDY ATLKVALAKS
             YVEAEEAXL. ..........
Bg8090pro    MNKKKMILTS LASVAILGAG LVTSQPTFVR AEEAP.VASQ PKAEKDYDPA
             GKKSEAATKA YEDAKP...T AEDAQKKYDE AQKKPDAER. ..........
             .......... .......... .......... .......... ..........
             .......... .......... .......... .......... ..........
             .......... ..........
Bg8743pro    MNKKKMILTS LASVAILGAG LVASQPTVVR AEEAP.VAKQ SQAERDYDAA
             MKKSEAAKKE YEEAKKDLEE AKAAQKKYGG DPKKTGEETK LVPK.ADGER
             PKANVAVPKA YLKLREAQEQ LNQSPNNKKN SAQQKLKDAL AHIDEVTLNQ
             KEAEA..... .......... .......... .......... ..........
             .......... ..........
Bg8838pro    MNKKKMILTS LASVAILGAG LVTSQPTVVR AEESP.VASQ SKAEKDYDAA
             VKNATAAKKA AEDAHRALDE AKAAQKNYDE DQKKPEEKAK EVPKAPAEE.
             .......... .......... .......... .......... ..........
             .......... .......... .......... .......... ..........
             .......... ..........
```

FIG. 13B

```
Bg9163pro     MNKKKMILTS LASVAILGAG LVASQPTLVR AEDAP.VANQ SQAEKDYDAA
              MKKSEAAKKE YEDAKKVLAE AEAAQKKYED DQKKTEEKA. ENANAASEEI
              AKATEEVH.. .......... .......... .......... ..........
              .......... .......... .......... .......... ..........
              .......... ..........
Bg9739pro     MNKKKMILTS LASVAILGAG LVASSPTVVR AEEAP.VASQ SKAEKDYDTA
              KRDAENAKKA LEEAKR.... ...AQEKYAD YQRRIEEKAA K.ETQASLEQ
              QEANKDYQLK LKKYLDGRNL SNSSVLKKEM EEAEKKDKEN QAEFNKIRRE
              IVVPNPQELE MARRKSEVVK ATESGLVTRV EEAEKNVTDA RQKLVLKCNE
              VVLQAXXAEL ESGGHKLEPK
Dbl1pro       MNKKKMILTS LASXAILGAG LVASQPTVVR AEEAP.VASQ SKAEKDYDAA
              KRDAENAKKA LEEAKR.... ...AQKXXED DQKKTEEKAK X.DXQASEAE
              QKANLXYQLL LQKYVSESDG KKKKEXEXXA DAAKKEIELK XADLXKIXQE
              .......... .......... .......... .......... ..........
              .......... ..........
Dbl5pro       MNKKKMILTS LASVAILGAG LVASQPTVVR AEEAP.VASQ SKAEKDYDAA
              VEKSKAAEED LE.......E AEAAQRKYDE DQKKSEENEK E.TEEASERQ
              QAATLKYHLE SXEFLNYFQD NHR....... .......... ..........
              .......... .......... .......... .......... ..........
              .......... ..........
Dbl6aapro     MNKKKMILTS LASVAILGAG LVASPPTVVR AEEAP.VASQ SKAEKDYDTA
              KRDAENAKKA LEEAKR.... ...AQEKYAD YQRRIEEKAA K.ETHASLEQ
              QEANKDYQLK LKKYLDGRNL SNSSVLKKEM EEAEKKDKEK PAEFNKIRRE
              IVVPNPQELE MARRKSEVAK TKESGLVKRV EEAEKKVTEA RPKLDAERAK
              EVVLQAQIA. ..........
```

FIG. 13C

```
Db16apro      MNKKKMILTS LASVAILGAG LVASPPTVVR AEEAP.VASQ SKAEKDYDTA
              KRDAENAKKA LEEAKR.... ...AQEKYAD YQRRIEEKAA K.ETHASLEQ
              QEANKDYQLK LKKYLDGRNL SNSSVLKKEM EEAEKKDKEK QAGL......
              .......... .......... .......... .......... ..........
              .......... ..........
Ef10197pro    MNKKKMILTS LASVAILGAG LVTSQPTLVR AEESP.VASQ SKAEKDYDAA
              KRDAENAKKA LEEAKR.... ...AQEKYAD YQRRIEEKAA K.EQQASLEQ
              QEANKDYQLK LKKYLDGRNL SNSSVLKKEM EEAEKKDKEK QAEFNKIRRE
              IVVPNPQELE MARRKSEVVK AKEEGLVKRV EEAEKKVTEA RQKLDAERAK
              EVVLQPTR*V ENEVHKLXQK
Ef3296pro     MNKKKMILTS LASVAILGAG LVTSQPTFVR AEESPQVVEK SSLEKKYEEA
              KAKADTAKKD YETAKK...K AEDAQKKYED DQKRTEEKAR K.EAEASQKL
              IDVALVVQNA YKEY....RE VQNQRSKYKS DADYQKKLTE VDSKIEKARK
              EQQDLQNNFN EVRAVVAPDP TCVGXDXR.. .......... ..........
              .......... ..........
Ef6796pro     MNKKKMILTS LASVAILGAG XVTSQPTXVR AEEAPQVVEK SSLEKKYEEA
              KAKYDAAKKD YDEAKK...K AAEAQKKYEE DQKKTEEKAE K.AKAASEEI
              AKATEEVQKA VLDYITAIRN HNDSGKTSAE EAENKAKERD YCCAGKKFDP
              IQTPFVASLT QMIL...... .......... .......... ..........
              .......... ..........
L81905pro     MNKKKMILTS LASVAILGAG LVASSPTVVR AEEAP.VASQ SKAEKDYDTA
              KRDAENAKKA LEEAKR.... ...AQEKYAD YQRRIEEKAA K.ETQASLEQ
              QEANKDYQLK LKKYLDGRNL SNSSVLKKEM EEAEKKDKEN QAEFNKIRRE
              IVVPNPQELE MA........ .......... .......... ..........
              .......... ..........
```

FIG. 13D

```
Rx1pro      MNKKKMILTS LASVAILGAG FVASQPTVVR AEESP.VASQ SKAEKDYDAA
            KKDAKNAKKA VEDAQKALDD AKAAQKKYDE DQKKTEEKA. ALEKAASEEM
            DKAVAAVQQA YLAYQQATDK AAKDAADKMI DEAKKREEEA KTKFNTVRAM
            VVPEPEQLAE TKKKSEEAKQ KAPELTKKLE EAKAKLEEAE KKATEAKQKV
            DA........ ..........
Wu2pro      MNKKKMILTS LASVAILGAG LVASQPTLVR AEESP.VASQ SKAEKDYDAA
            VKKSEAAKKA YEEAKKALEE AKVAQKKYED DQKKTEEKA. ELEKEASEAI
            AKATEEVQQA YLAYQRASNK A..EAAKMIE EAQRRENEAR AKFTTIRTTM
            VVPEPEQLAE TKKKAEEAKA KEPKLAKKAA EAKAKLEEAE KKATEANPQV
            DA........ ..........
Ef5668pro   MNKKKMILTS LASVAILGAG FVASSPTFVR AEEAP.VANQ SKAEKDYDAA
            VKKSEAAKKD YETAKK...K AEDAQKKYDE DQKKTEAKAE K.ERKASEKI
            AEATKEVQQA YLAYLQASNE SQRKEADKKI KEATHAKMRR TCNLTIEFEQ
            QLYFLNQVSY LRLRKKQKRQ QKKQKYLRKN LKRQLKRYKY RKIKYLNKML
            KTKRKL.... ..........
Bg6692pro   MNKKKLIVTS LASVAILGAD SVTSPPALVR ADEASLIASQ SKAEKDYDAA
            KKDAKNAKKA VEDAQKALDD AKAAQKKYDE DQKKTEKKAA AV.KKIDEEH
            QAANLKSQQA LVEFLAAQRE GNPKKKKAAQ ATLEEAENAE KETK......
            .......... .......... .......... .......... ..........
            .......... ..........
```

FIG. 13E

```
Ac122pro     MNKKKMIKTS LASAAIFGAX SETSQPTRVR PVEAPE.ARH PKVDKYYDAE
             ADEY...... .......... .......... .......... ..........
             .......... .......... .......... .......... ..........
             .......... .......... .......... .......... ..........
             .......... ..........
A66pro       MNKKKMILTS LASVAILGAG FGCVSAYSCK SRRISRS*SA *SSQRL....
             .......... .......... .......... .......... ..........
             .......... .......... .......... .......... ..........
             .......... .......... .......... .......... ..........
             .......... ..........
L82013pro    MNKKKMILKS LASAAISGAX LVXPQPTLVR AEESP.AASQ SHPEQDYDXX
             XXLCXXLXHQ PSXGRTLLXX XXSXPXSPTP XXXXXXPXSX LTXLXPLXXX
             LKPFPLPXSX PXPPXPPXSP PSPPPRPXLY XXPPXPXPXL SLXLIPFLLL
             XLPPPXXXLP HLXSPPXPXL PPSPTPX... .......... ..........
             .......... ..........
```

FIG. 13F

SEKVENSSIT KESKIALUEESSA - (sisältää alfa-kierteen karboksipäätteen ja alueen ja osan proliinirikkaasta alueesta. Välit on istutettu, jotta samankaltaiset PspA-sekvenssit saataisiin vastaamaan mahdollisimman hyvin toisiaan.)

```
 30 336
0922134c     .......... .......... .......... .......... ..........
             .........L KEIDESDSED YLKEGLRAPL QSKLDTKKAK LSKLEELSDK
             IDELDAEIAK LEVQLKDAEG NNNVE..... A.YFKEGLEK TTAEKKAELE
             KAEADLKKAV DEPETPAPA. ......PQPA PAPEKPAE.. .........K
             PAPAPAP... EKPAPAPE.. ....K.PAEK PAEKPAEEPA EKPAPAPEK.
             .......... ....PAPTPE .KPAPTPETP KTGWKQENGM ..........
             .......... .......... .......... ......
Atcc6303c    .......... .......... ..,......V LDXTIAEGKA GIAAXPPNID
             KT....PKDL EDSGLGLEKV LATLDPGGET PDGLDKEASE DSNIGALPNQ
             VSDLENQVSE LDREVTRLPS DLKDTEGNNV GDYVKGGLEK ALTDEKVGLN
             NTPKALDTAP KALDTALNEL G.PDGDEEET PAPAPKPE.. .......QPA
             EQP.....K. .......... ....PAPAPK PEKTDDQQAE EDYARRSEEE
             YNRLPQQQPP KAEK..PAPA PKPEQPVPAP .......... ..........
             .......... .......... .......... ......
Ac122c       .......... .......... .......... .......GGW SWR*ILLARP
             DRLAARQAEL AQKQTELGKL LDSLDPEGKT QDELDKEAGE ....AELDKK
             ADGLPNKVSD LEKEISNLEI LLGGADSEDD T....AALPN KLATKKAELE
             KTQKELDAAL NELG...... ..PDGDEEET PAPAPQPE.. .........Q
             PAPAPKPEQ. .......... ....PTPAPK PEQPTPAPKP EQ..PAP...
             ........AP KPEQ..PAPA PKPEQPAPAP KP.EQPTPGP KIE.......
             .......... .......... .......... ......
```

FIG. 13G

```
A66c      .......... .......... .......... .......... ..........
          .......... .......... .......... .......... ..........
          .......... .......... .......... .........E LLLLEKAGLG
          KAGADLKEAV NEPGESAGEP SQPEEPAEEA PAPEQPTEPT ..........
          .....QPEEP AGETPAPKPE K...PAGQPK AEKTDDQQAE EDYARRSEEE
          YNRLTQQQPP KAEKPAPA.. PQPEQPAPAP K......... ..........
          .......... .......... .......... ......
Ac94c     .......... .......... .......... .......... ..........
          .........L KEIDESDSED YVKEGLRVPL QSELDVKQAK LLKLEELSDK
          IDELDAEIAK NLKKDVEDFQ NSGGGYS... .ALYLEAAEK DLVAKKAELE
          KTEADLKKAV NEPEKPAEE. .......... ..PENPAP.. .......APK
          PAPAPQP... ...EKPA... ....PAPAPK PEKSADQQAE EDYARRSEEE
          YNRLTQQQPP KAEKPAPAPV PKPEQPAPAP KSR....... ..........
          .......... .......... .......... ......
Bg8090c   VXLDRGPAEA AVKEQVDSPP QQLAD*VKEI STRGKFLGGA ATEDETSALP
          NKITAKQAEL AKKQTELEKL LDNLDPEGKT QDELDKEAAE ....AELDKK
          ADELPNKVAD LEKEISNLEI LLGGADPEDD T....AALPN KLATKKAEFE
          KTPKELDAAL NELG...... ..PDGDEEET PA........ ..........
          PAPAPKPEQ. .......... ....PAPA.. .....PAPKP EQPAPAP...
          ........AP KPEQPAPAPA PKPEQPTPAP K......... ..........
          .......... .......... .......... ......
```

FIG. 13H

```
Bg8743c     .......... .......... .......... .......... ..........
            .........L KEIDESDSED YIKEGLRAPL QSKLDAKKAK LSKLDELSDK
            IDELDAEIAK LEKDVGDFPN SDGEQ..... AGQYLVAAEK DLDAKEAELG
            NTGADLKKAV DEPETPAPA. ......PAPK PAPAPAPT.. .........P
            EAPAPA.... PKPAPAPK.. ....PAPAPK PAPAPKPAPA PKPAPAPK..
            .......... ..PAPAPKPE RT........ .......... ..........
            .......... .......... .......... ......
Bg9163c     .......... .......... .......... .......... ........END
            GVQRTRKRAP KRIMSLSQKV XLKXVCRAPL QSKLDAQKAE LLKLEELSGK
            IEELDAEIAE LEVQLKDAEG NNNVE..... A.YFKEGLEK TTAEKKAELE
            XAXADLKKAV DEPETPAPA. ......PAPA PAP....... .........A
            PAPAPA.... PAPAPAPK.. ....PAPAPK PAPAPAPAPA PKPAPAPK..
            .......... ..PAPAPAPA PKPEKPAEKP APAPKPETXK TYG.......
            .......... .......... .......... ......
Bg9739c     .......... .......... .......... .......... ..........
            .........L KEIDESDSED YVREGFRAPL QSELDAKQAK LSKLEELSDK
            IDELDAEIAK LEKDVEDFQN SDGEQ..... AGQYLAAAGE DLIAKKAELE
            KAEADLKKAV DEPETPAPA. ......PA.. PAPAPAPT.. .........P
            EAPAPAPAPA PKPAPAPK.. ....PAPAPK PAPAPKPAPA PKPAPAPK..
            .......... ..PAPAPAPA PKPEKPAEKP APAPKPE... ..........
            .......... .......... .......... ......
```

FIG. 131

```
Ef1019c     .......... .......... .......... .......... ..........
            .........L KEIDESDSED YVKEGFRAPL QSELDAKQAK LSKLEELSDK
            IDELDAEIAK LEDQLKAAEE NNNVE..... .DYFKEGLEK TIAAKKAELE
            KTEADLKKAV NEPEKPAEEP SQPEKPAEEA PAPEQPTEPT QPEKPAEQPQ
            PAPAPQPEKP AEETPAPKPE K...PAEQPK AEKPADQQAE EDYARRSEEE
            YNRLTQQQPP KAEKPAPA.. PKTK..... .......... ..........
            .......... .......... .......... ......
Ef3296c     .......GGS ALDQEAAAPP HQVADLEKQI TGPEIFLGGA DPEADIAARP
            NELAAKQAEL AQKPTGLEKL LDSLDPGGKT QDELDKEAGE ....AELDKK
            ADELPNKVAD LEKEISNLEI LLGGADSEDD T....AALPN KLAXKXAELE
            KTQKELDAAP NELG...... ..PDGDEEET PAPAPQPE.. .........Q
            PAPAPKPEQ. .......... ....PAPAPK PEQPAPAPKP EQ..PAP...
            ........AP KPEQ..PAPA PKPEQPAKPE KPAEEPTQPE KPATPKT...
            .......... .......... .......... ......
Ef6796xc    .......... .......... .......... .......... ..........
            .......... .......... .......... .......... .........R
            VRAL..KVAE FGVQLRDAGG SNNVG..... A.YFKEGLEE TTAEXEAGLG
            KAEADLKKAV DEPET..... .......... PAP....... .........A
            PAPAPA.... PAPAPAPK.. ....PAPAPK PAPAPAPAPA PKPAPAPK..
            .......... ..PAPAPAPA PKPEKPAEKP APAPKPETPK T.........
            .......... .......... .......... ......
```

FIG. 13J

```
Dbl5c      .......... .......... .......... .......... ..........
           .........L KDIDESDSED YAKEGLRAPL QSELDTKKAK LLKLEELSGK
           IEELDAEIXE LEVQLKDAEG NNNVE..... A.YFKEGLEK TTAEKKAELE
           KAEADLKKAV DEPETPAPA. ......PAPA PAPAPTPE.. .........A
           PAPAPA.... PKPAPAPK.. ....PAPAPK PAPAPKPAPA PKPAPAPKPA
           PAPAPAPAPK PAPAPAPAPA PKPEKPAEKP APAPKPETPK TGWKQENGM.
           .......... .......... .......... ......
L81905c    .......... .......... .......... .......... ..........
           .........L KEIDESDSED YVKEGFRAPL QSELDAKQAK LSKLEEKSDK
           XDELDAEIAK LEKDVEDFKN SDGEQ..... AGQYLAAAEE DLIAKKAXLE
           KAEADLKKAV DEPETPAPA. ......PA.. PAPAPAPT.. .........P
           EAPAPA.... ..PAPAPK.. ....PAPAPK PAPAPKPAPA PKPAPAPK..
           .......... ..PAPAPAPA PKPEKPAA.. .......... ..........
           .......... .......... .......... ......
Rct115c    .......... .......... .......... .......... ..........
           .......... .......... .......... .......... ..........
           .......... LKEIDESDVE VKKAELELVK EEAKEPRNEE KVKQAKAEVE
           SKKAEATRLE KIKTDRKKAE EAKRKAAEED KVKEK..... ..........
           ..PAPKPEN. .......... ....PAEQPK AEKPADQQAE EDYARRSEEE
           YXRLTQQQPP KTEKPAQPST PKT....... .......... ..........
           .......... .......... .......... ......
```

FIG. 13K

```
Rct121c   .......... .......... .......... .......... ..........
          .......... .......... .......... .......... ..........
          .......... .......... .........K GEARESRXEE KVNQPKXEVE
          SKKXEATRLE KIKTDRKKAE EAXRKAAEED KVKEKPAEQP QPAPAPQPEK
          PAPAPKPEN. .......... ....PAEQPK AEKPADQQAE EDYARRSEEE
          YNRLTQQQPP KTEKPAQPST XK........ .......... ..........
          .......... .......... .......... ......
Rct123c   .......... .......... .......... .......... ..........
          .........I KEXDESXSED YLKEGLRAPL QSKLDTKKAK LSKLEELSDK
          IDELDAEIAK LEVQLKDAEG NNNVE..... A.YFKEGLEK TTAEKKAELE
          KAEADLKKAV DEPETPAPA. ......PQPA PAPEKPAE.. .........K
          PAPAPAP... .......... .......... .......... EKPAPAPEK.
          .......... ....PAPTPE .KPAPTPETP KTGWKQENGM WYFYNTDGSM
          ATGWLQNNGS WYYLNSNGAM ATGWHQNNGS WYYLNS
Rct129c   .......... .......... .......... .......... ..........
          .........L KEIDESDSED YLKEGLRAPL QSKLDTKKAK LSKLEELSDK
          IDELDAEIAK LEVQLKDAEG NNNVE..... A.YFKEGLEK TTAEKKAELE
          KAEADLKKAV DEPDTPAPA. ......PQPA PAPEKPAE.. .........K
          PAPAPAP... EKPAPAPE.. ....K.PAPA PEKPAP..AP EKPAPAPEK.
          .......... ....PAPAPE .KPAPAPEKP APAPKPETPE TRLETRKRY.
          .......... .......... .......... ......
```

FIG. 13L

```
Rct135c     .......... .......... .......... .......... ..........
            .........L KEIDESDSED YLKEGLRAPL QSKLDTKKAK LSKLEELSDK
            IDELDAEIAK LEVQLKDAEG NNNVE..... A.YFKEGLEK TTAEKKAELE
            KAEADLKKAV DEPETPAPA. ......PQPA PAPEKPAE.. .........K
            ..PAPAP... EKPAPAPE.. ....K.PAPA P......... EKPAPAPEK.
            .......... ....PAPAPE .KPAPTPETP KTGWKQENGM ..........
            .......... .......... .......... ......
RX1c        .......... .......... .......... .......... ..........
            .........L KEIDESESED YAKEGFRAPL QSKLDAKKAK LSKLEELSDK
            IDELDAEIAK LEDQLKAAEE NNNVE..... .DYFKEGLEK TIAAKKAELE
            KTEADLKKAV NEPEKPA... .....PAPET PAPEAPAE.. .......QPK
            PAPAPQP... ...APAPKPE K...PAEQPK PEKTDDQQAE EDYARRSEEE
            YNRLTQQQPP KAEKPAPA.. PKTGWKQENG MWYFYNTDGS M........
            .......... .......... .......... ......
Bg6692c     .......... .......... .......... .......... ..........
            .......... .......... .......... .......... ..........
            .......... .......... ...GEQA... .GQYRAAAEG DLAAKQAELE
            KTEADLKKAV NEPEK..PA. .....PAPET PAPEAPAE.. .......QPK
            PAPAPQP... ...APAPKPE K...PAEQPK AEKTDDQQAE EDYARRSEEE
            YNRLTQQQPP KAEKPAPA.. PKPEQPAPA. .......... ..........
            .......... .......... .......... ......
```

FIG. 13M

```
Bg8838c     .......... .......... .......... .......... ..........
            .......... .......... .......... .......... ..........
            .......... ........PK NSKGEQA... .EQYRSAAGG DLAAKQVELE
            KTEADLKKAV NEPEK..PA. .....PAPET PAPEAPAE.. .......QPK
            PAPAPQP... ...APAPKPE K...PAEQPK AEKPADQQAE EDYDRRSEEE
            YNRLTQQQPP KAEKPAPA.. PQPEQPAPAP KS........ ..........
            .......... .......... .......... ......
Dbl6ac      .......... .......... .......... .......... ..........
            .........L KEIDESDSED YVKEGFRAPL QSELDAKQAK LSKLEELSDK
            IDELDAEIAK .LEKDVEDFK XSDGEQA... .GQYLAAAEE DLIAKKAELE
            QTEADLKKAV NEPGKPAPA. .....PAPET PAPEAPAE.. .......QPK
            PAPET.P... ...APAPKPE K...PAEQPK PEKPADQQAE EDYARRSEEE
            YNRLTQQQPA PAQKPEQP.. AKPEKPAEEP TQPEK..... ..........
            .......... .......... .......... ......
Dbl1c       .......... .......... .......... .......... ..........
            .......... .......... .......... .......... ..........
            ....DAEIAK .LEKNVEYFK KTDAEQT... .EQYLAAAEK DLADKKAELE
            KTEADLKKAV NEPEKPAEE. .....TPAPA PKPEQPAE.. .......QPK
            PAPAPQP... ...APAPKP. .......... .EKTDDQQAE EDYARRSEEE
            YNRLPQQQPP KAEKPAPA.. PKPEQPVP.. .......... ..........
            .......... .......... .......... ......
```

FIG. 13N

```
L820131c   .......... .......... .......... .......... ..........
           .......... .......... .......... .......... ..........
           .......... .......... .......... .......... ..........
           .......... .......... .........A EXPENPAP.. .......APK
           PAXAPQPLKP EEPAEQPKPE KPEEPAGQPE PEKPDDQQAG EDYARRSGGE
           YNRFPQQQPP KAEKPAPA.. PKPEQPVPAP KT........ ..........
           .......... .......... .......... ......
Bg11703c   .......... .......... .......... .....LLKKA KLAGAKSKAA
           TKKAELEPEL EKAEAELENL LSTLDPEGKT QDELDKEAAE ....AELNKK
           VEALPNQVSE LEEELSKLED NLKDAETNNV EDYIKEGLEE AIATKQAELE
           KT.......P KELDAALNEL G.PDGDEEET PPPEAPAE.. .......QPK
           PEK.PAEET. .......... ....PAPAPK PEKSADQQAE EDYARRSEEE
           YNRLTQQQPP KAEKPAPAPA PKPEQPAPAP KSR....... ..........
           .......... .......... .......... ......
Bg7817c    .......... .......... .......... ..GLATKKKL NLAEARIELL
           LKKLGLEPGL EKAGAGLGNL LSTLDPEGKT QDELDKEAAE ....AELNKK
           VEALPNQVAE LEEELSKLED NLKDAETNHV EDYIKEGLEE AIATKQAELE
           KT.......P KELDAALNEL G.PDGDEEET PAPEAPAE.. .......QPK
           PEK.PAEET. .......... ....PAPAPK PEKSADQQAE EDYARRSEEE
           YNRLTQQQPP KAEKPAPAPA PKPEQPAPAP K......... ..........
           .......... .......... .......... ......
```

FIG.130

```
Bg7561c    .......... .......... .......... .......... ..........
           .......... KKQKVNLENL LSTLDPGGKT QDELDKGAAE ....AELNKK
           VEALPNPVXE LEEELSPPED NLKDAETNHV EDYIKEGLEE AIATKQAELE
           ET.......P QEVDAALNDL V.PDGGEEET PAPAPQPD.. .......EPA
           PAPAPNAEQ. .......... ....PAPAPK PEKSADQQAE EDYARRSEGE
           YNRLTQQQPP KAEKPAPAPA PKPEQPAPAP N......... ..........
           .......... .......... .......... ......
Ef5668c    .....KEIAR LQSDLKDAEE NNVEDYIKEG LEQAITNKKA ELATTQQNID
           KT....QKDL EDAELELEKV LATLDPEGKT QDELDKEAAE ....AELNEK
           VEALQNQVAE LEEELSKLED NLKDAETNNV EDYIKEGLEE AIATKKAELE
           KT.......Q KELDAALNEL G.PDGDEEET PAPAPQPE.. .......KPA
           EEP....EN. .......... ....PAPAPK PEKSADQQAE EDYARRSEEE
           YNRLTQQQPP KAEK..PAPA PQPEQPAPAP KIE....... ..........
           .......... .......... .......... ......
Wu2c       .......... .......... .......... .......... ..........
           .........L KEIDESESED YAKEGFRAPL HSKLDAKKAK LSKLEELSDK
           IDELDAEIAK LEDQLKAVEE NNNVE..... .DYSTEGLEK TIAAKKTELE
           KTEADLKKAV NEPEKSAEEP SQPEKPAEEA PAPEQPTEPT ..........
           .....QPEKP AEETPAPKPE K...PAEQPN AEKTDDQQAE EDYARRSEEE
           YNRLTQQQPP KAEKPAPA.. PQPEQTSSLH .......... ..........
           .......... .......... .......... ......
```

FIG. 13P

EP5668 pspA:n täydellinen sekvenssi
Sekvenssialue 1–1453

```
        10         20         30         40         50         60         70
         *          *          *          *          *          *          *
TTGACAAATA TTTACGGAGG AGGCTTATGC TTAATATAAG TATAGGCTAA AAATGATTAT CAGAAAAGAG

        80         90        100        110        120        130
         *          *          *          *          *          *
GTAAATTTAG ATG AAT AAG AAA AAA ATG ATT TTA ACA AGC CTA GCC AGC GTC GCT ATC TTA GGG
            M   N   K   K   K   M   I   L   T   S   L   A   S   V   A   I   L   G>

    140        150        160        170        180        190
     *          *          *          *          *          *
GCT GGT TTT GTT GCG TCT TCG CCT ACT TTT GTA AGA GCA GAA GAA GCT CCT GTA GCT AAC
 A   G   F   V   A   S   S   P   T   F   V   R   A   E   E   A   P   V   A   N>

    200        210        220        230        240        250
     *          *          *          *          *          *
CAG TCT AAA GCT GAG AAA GAC TAT GAT GCA GCA GTG AAA AAA TCT GAA GCT GCT AAG AAA
 Q   S   K   A   E   K   D   Y   D   A   A   V   K   K   S   E   A   A   K   K>

    260        270        280        290        300        310
     *          *          *          *          *          *
GAT TAC GAA ACG GCT AAA AAG AAA GCA GAA GAC GCT CAG AAG AAA TAT GAT GAG GAT CAG
 D   Y   E   T   A   K   K   K   A   E   D   A   Q   K   K   Y   D   E   D   Q>

    320        330        340        350        360        370
     *          *          *          *          *          *
AAG AAA ACT GAG GCA AAA GCG GAA AAA GAA AGA AAA GCT TCT GAA AAG ATA GCT GAG GCA
 K   K   T   E   A   K   A   E   K   E   R   K   A   S   E   K   I   A   E   A>

    380        390        400        410        420        430
     *          *          *          *          *          *
```

FIG. 13Q

```
ACA AAA GAA GTT CAA CAA GCG TAC CTA GCT TAT CTA CAA GCT AGC AAC GAA AGT CAG AGA
 T   K   E   V   Q   Q   A   Y   L   A   Y   L   Q   A   S   N   E   S   Q   R>

    440         450         460         470         480         490
     *           *           *           *           *           *
AAA GAG GCA GAT AAG AAG ATA AAA GAA GCT ACG CAC GCA AAG ATG AGG CGG ACG TGC AAT
 K   E   A   D   K   K   I   K   E   A   T   H   A   K   M   R   R   T   C   N>

    500         510         520         530         540         550
     *           *           *           *           *           *
TTG ACT ATC GAA TTC GAA CAA CAA TTG TAC TTC CTG AAC CAA GTG AGT TAC CTG AGA CTA
 L   T   I   E   F   E   Q   Q   L   Y   F   L   N   Q   V   S   Y   L   R   L>

    560         570         580         590         600         610
     *           *           *           *           *           *
AGA AAA AAG CAG AAG AGG CAA CAA AAG AAG CAG AAG TAT CTA AGA AAA AAT CTG AAG AGG
 R   K   K   Q   K   R   Q   Q   K   K   Q   K   Y   L   R   K   N   L   K   R>

    620         630         640         650         660         670
     *           *           *           *           *           *
CAG CTA AAG AGG TAT AAG TAT AGA AAA ATA AAA TAC TTG AAC AAG ATG CTG AAA ACG AAA
 Q   L   K   R   Y   K   Y   R   K   I   K   Y   L   N   K   M   L   K   T   K>

    680         690         700         710         720         730
     *           *           *           *           *           *
AGA AAA TTG ACG TAC TTC AAA ACA AAG TCG CTG ATT TAT AAA AAG GAA TTG CTC TCC ATC
 R   K   L   T   Y   F   K   T   K   S   L   I   Y   K   K   E   L   L   S   I>

    740         750         760         770         780         790
     *           *           *           *           *           *
AAA ACA GTC GCT GAA TTA AAT AAA GAA ATT GCT AGA CTT CAA AGC GAT TTA AAA GAT GCT
 K   T>
         V   A   E   L   N   K   E   I   A   R   L   Q   S   D   L   K   D   A>

    800         810         820         830         840         850
     *           *           *           *           *           *
```

FIG.13R

```
GAA GAA AAT AAT GTA GAA GAC TAC ATT AAA GAA GGT TTA GAG CAA GCT ATC ACT AAT AAA
 E   E   N   N   V   E   D   Y   I   K   E   G   L   E   Q   A   I   T   N   K>

    860         870         880         890         900         910
     *           *           *           *           *           *

AAA GCT GAA TTA GCT ACA ACT CAA CAA AAC ATA GAT AAA ACT CAA AAA GAT TTA GAG GAT
 K   A   E   L   A   T   T   Q   Q   N   I   D   K   T   Q   K   D   L   E   D>

    920         930         940         950         960         970
     *           *           *           *           *           *

GCT GAA TTA GAA CTT GAA AAA GTA TTA GCT ACA TTA GAC CCT GAA GGT AAA ACT CAA GAT
 A   E   L   E   L   E   K   V   L   A   T   L   D   P   E   G   K   T   Q   D>

    980         990         1000        1010        1020        1030
     *           *           *           *           *           *

GAA TTA GAT AAA GAA GCT GCT GAA GCT GAG TTG AAT GAA AAA GTT GAA GCT CTT CAA AAC
 E   L   D   K   E   A   A   E   A   E   L   N   E   K   V   E   A   L   Q   N>

   1040        1050        1060        1070        1080        1090
     *           *           *           *           *           *

CAA GTT GCT GAA TTA GAA GAA GAA CTT TCA AAA CTT GAA GAT AAT CTT AAA GAT GCT GAA
 Q   V   A   E   L   E   E   E   L   S   K   L   E   D   N   L   K   D   A   E>

   1100        1110        1120        1130        1140        1150
     *           *           *           *           *           *
```

FIG. 13S

```
ACA AAC AAC GTT GAA GAC TAC ATT AAA GAA GGT TTA GAA GAA GCT ATC GCG ACT AAA AAA
 T   N   N   V   E   D   Y   I   K   E   G   L   E   E   A   I   A   T   K   K>

   1160        1170        1180        1190        1200        1210
      *           *           *           *           *           *
GCT GAA TTG GAA AAA ACT CAA AAA GAA TTA GAT GCA GCT CTT AAT GAG TTA GGC CCT GAT
 A   E   L   E   K   T   Q   K   E   L   D   A   A   L   N   E   L   G   P   D>

   1220        1230        1240        1250        1260        1270
      *           *           *           *           *           *
GGA GAT GAA GAA GAG ACT CCA GCG CCG GCT CCT CAA CCA GAA AAA CCA GCT GAA GAG CCT
 G   D   E   E   E   T   P   A   P   A   P   Q   P   E   K   P   A   E   E   P>

   1280        1290        1300        1310        1320        1330
      *           *           *           *           *           *
GAG AAT CCA GCT CCA GCA CCA AAA CCA GAG AAG TCA GCA GAT CAA CAA GCT GAA GAA GAC
 E   N   P   A   P   A   P   K   P   E   K   S   A   D   Q   Q   A   E   E   D>

   1340        1350        1360        1370        1380        1390
      *           *           *           *           *           *
TAT GCT CGT AGA TCA GAA GAA GAA TAT AAT CGC TTG ACC CAA CAG CAA CCG CCA AAA GCA
 Y   A   R   R   S   E   E   E   Y   N   R   L   T   Q   Q   Q   P   P   K   A>

   1400        1410        1420        1430        1440        1450
      *           *           *           *           *           *
GAA AAA CCA GCT CCT GCA CCA CAA CCA GAG CAA CCA GCT CCT GCA CCA AAA ATA GAG GC
 E   K   P   A   P   A   P   Q   P   E   Q   P   A   P   A   P   K   I   E   A>
```

FIG. 13T

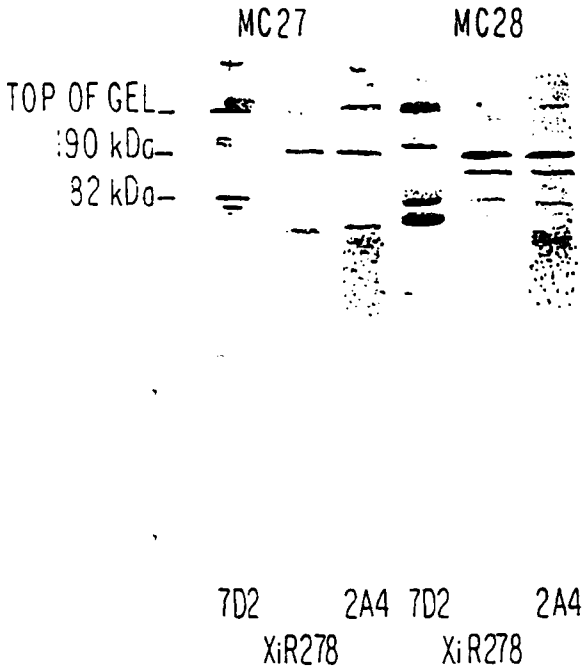
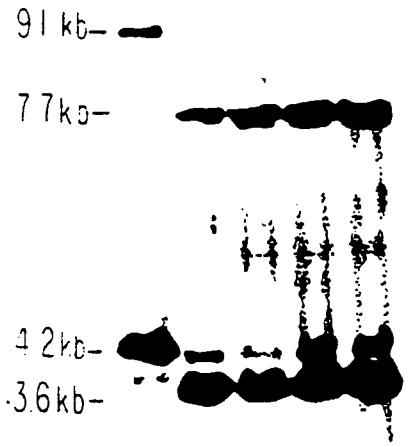

MC27
MC28
TOP OF GEL
190 kDa
82 kDa
7D2
2A4
7D2
2A4
XiR278
XiR278

FIG. 14

FIG. 15A

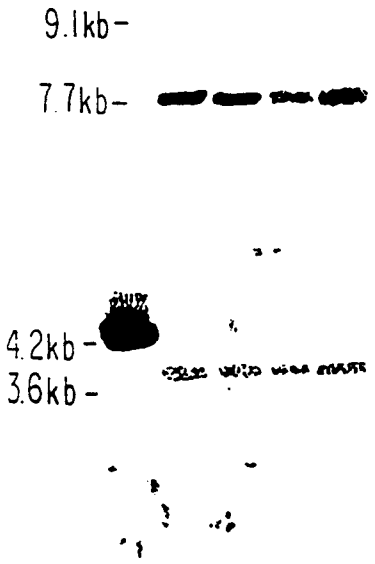
LSMpspAI3 / 2



RXI MC26 MC28
MC25 MC27

FIG. 15B

LSMpspAI2 / 6



RXI MC26 MC28
MC25 MC27

Aluke LSM13: gcaagcttatgatatagaaatttgtaac
Aluke LSM2: gcgcgtcgacggcttaaacccattcaccattgg

Probe LSMpspA13/2 (from RX1 sequence):

```
aagcttatga tatagaaatt tgtaacaaaa atgtaatata aaacacttga
caaatattta cggaggaggc ttatacttaa tataagtata gtctgaaaat
gactatcaga aaagaggtaa atttagatga ataagaaaaa aatgatttta
acaagtctag ccagcgtcgc tatcttaggg gctggttttg ttgcgtctca
gcctactgtt gtaagagcag aagaatctcc cgtagccagt cagtctaaag
ctgagaaaga ctatgatgca gcgaagaaag atgctaagaa tgcgaaaaaa
gcagtagaag atgctcaaaa ggctttagat gatgcaaaag ctgctcagaa
aaaatatgac gaggatcaga agaaaactga ggagaaagcc gcgctagaaa
aagcagcgtc tgaagagatg gataaggcag tggcagcagt tcaacaagcg
tatctagcct atcaacaagc tacagacaaa gccgcaaaag acgcagcaga
taagatgata gatgaagcta agaaacgcga agaagaggca aaaactaaat
ttaatactgt tcgagcaatg gtagttcctg agccagagca gttggctgag
actaagaaaa aatcagaaga agctaaacaa aaagcaccag aacttactaa
aaaactagaa gaagctaaag caaaattaga agaggctgag aaaaaagcta
ctgaagccaa acaaaaagtg gatgctgaag aagtcgctcc tcaagctaaa
atcgctgaat tggaaaatca agttcataga ctagaacaag agctcaaaga
gattgatgag tctgaatcag aagattatgc taaagaaggt ttccgtgctc
ctcttcaatc taaattggat gccaaaaaag ctaaactatc aaaacttgaa
```

FIG.15C

gagttaagtg ataagattga tgagttagac gctgaaattg caaaacttga
agatcaactt aaagctgctg aagaaaacaa taatgtagaa gactacttta
aagaaggttt agagaaaact attgctgcta aaaaagctga attagaaaaa
actgaagctg accttaagaa agcagttaat gagccagaaa aaccagctcc
agctccagaa actccagccc cagaagcacc agctgaacaa ccaaaaccag
cgccggctcc tcaaccagct cccgcaccaa aaccagagaa gccagctgaa
caaccaaaac cagaaaaaac agatgatcaa caagctgaag aagactatgc
tcgtagatca gaagaagaat ataatcgctt gactcaacag caaccgccaa
aagctgaaaa accagctcct gcaccaaaaa caggctggaa acaagaaaac
ggtatgtggt acttctacaa tactgatggt tcaatggcga caggatggct
ccaaaacaac ggttcatggt actacctcaa cagcaatggt gctatggcta
caggttggct ccaatacaat ggttcatggt attacctcaa cgctaacggc
gctatggcaa caggttgggc taaagtcaac ggttcatggt actacctcaa
cgctaatggt gctatggcta caggttggct ccaatacaac ggttcatggt
attacctcaa cgctaacggc gctatggcaa caggttgggc taaagtcaac
ggttcatggt actacctcaa cgctaatggt gctatggcta caggttggct
ccaatacaac ggttcatggt actacctcaa cgctaacggt gctatggcta
caggttgggc taaagtcaac ggttcatggt actacctcaa cgctaatggt
gctatggcaa caggttgggt gaaagatgga gatacctggt actatcttga
agcatcaggt gctatgaaag caagccaatg gttcaaagta tcagataaat
ggtactatgt caatggttta ggtgcccttg cagtcaacac aactgtagat
ggctataaag tcaatgccaa tggtgaatgg gtttaagccg

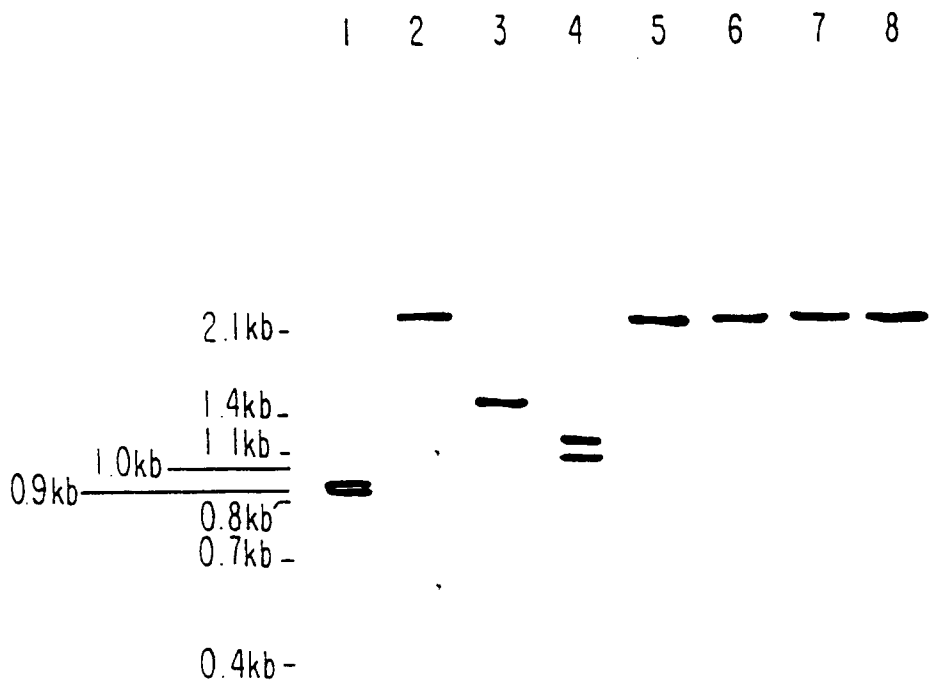
FIG. 15D

Aluke LSM12: ccggatccagcgtcgctatcttaggggctggtt
Aluke LSM6: ctgagtcgactggagtttctggagctggagc

Probe LSMpspA12/6 (from RX1 sequence):
ccagcgtcgc tatcttaggg gctggttttg ttgcgtctca gcctactgtt
gtaagagcag aagaatctcc cgtagccagt cagtctaaag ctgagaaaga
ctatgatgca gcgaagaaag atgctaagaa tgcgaaaaaa gcagtagaag
atgctcaaaa ggctttagat gatgcaaaag ctgctcagaa aaaatatgac
gaggatcaga agaaaactga ggagaaagcc gcgctagaaa aagcagcgtc
tgaagagatg gataaggcag tggcagcagt tcaacaagcg tatctagcct
atcaacaagc tacagacaaa gccgcaaaag acgcagcaga taagatgata
gatgaagcta agaaacgcga agaagaggca aaaactaaat ttaatactgt
tcgagcaatg gtagttcctg agccagagca gttggctgag actaagaaaa
aatcagaaga agctaaacaa aaagcaccag aacttactaa aaaactagaa
gaagctaaag caaaattaga agaggctgag aaaaaagcta ctgaagccaa
acaaaaagtg gatgctgaag aagtcgctcc tcaagctaaa atcgctgaat
tggaaaatca agttcataga ctagaacaag agctcaaaga gattgatgag
tctgaatcag aagattatgc taaagaaggt ttccgtgctc ctcttcaatc
taaattggat gccaaaaaag ctaaactatc aaaacttgaa gagttaagtg
ataagattga tgagttagac gctgaaattg caaaacttga agatcaactt
aaagctgctg aagaaaacaa taatgtagaa gactacttta aagaaggttt
agagaaaact attgctgcta aaaaagctga attagaaaaa actgaagctg
accttaagaa agcagttaat gagccagaaa aaccagctcc agctccagaa
actccag

FIG. 15E

FIG. 16



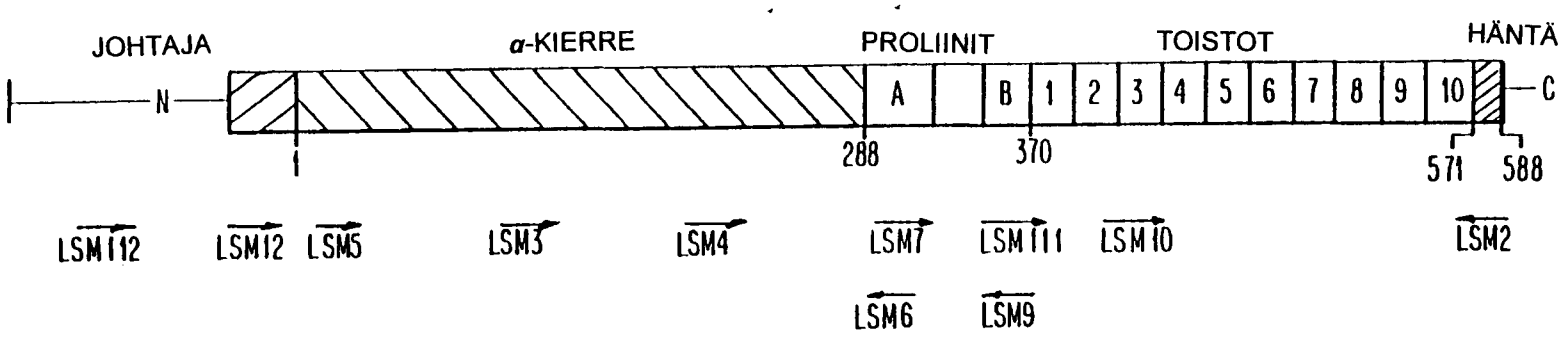

JOHTAJA
α-KIERRE
PROLIINIT
TOISTOT
HÄNTÄ
N
C
A
B
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
1
288
370
571
588
LSM112
LSM12
LSM5
LSM3
LSM4
LSM7
LSM111
LSM10
LSM2
LSM6
LSM9

FIG.17

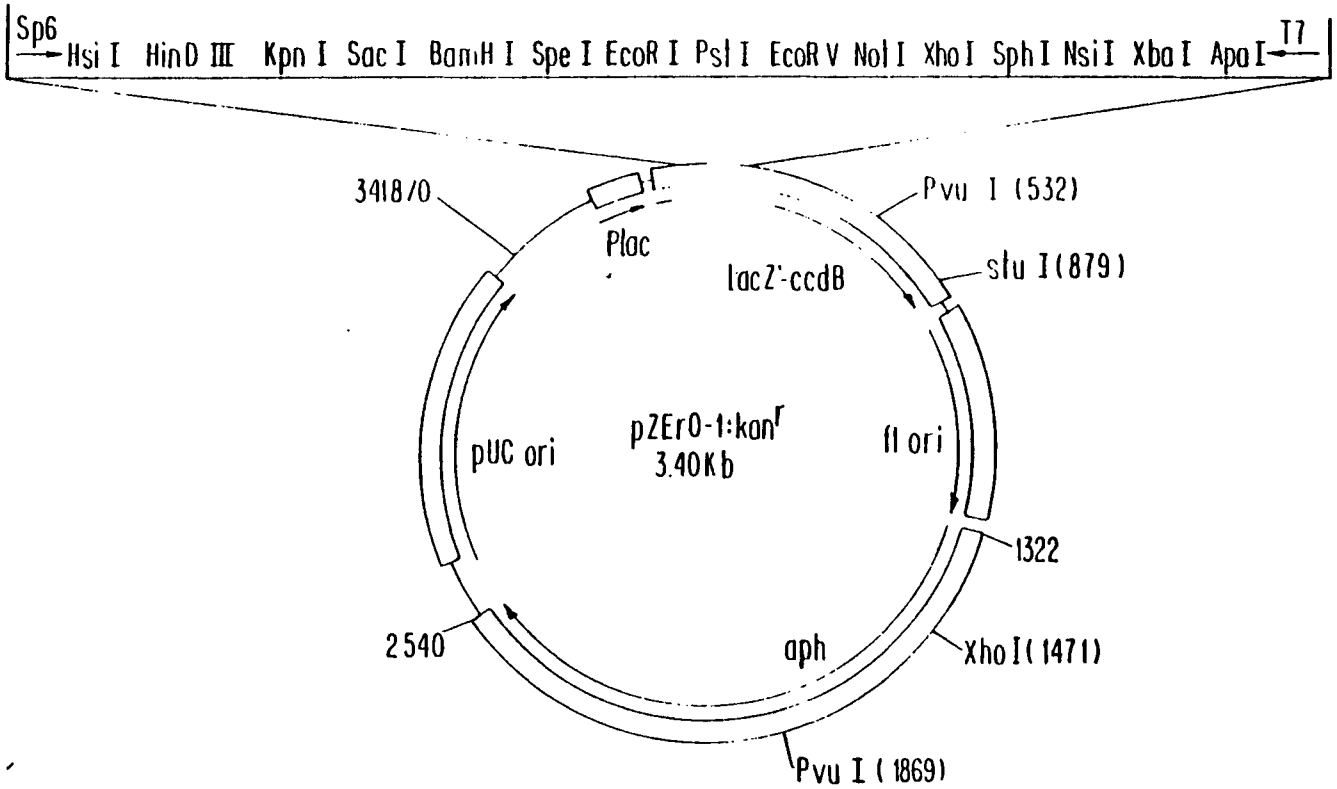

Sp6
Hsi I
HinD III
Kpn I
Sac I
BamH I
Spe I
EcoR I
Psl I
EcoR V
Not I
Xho I
Sph I
Nsi I
Xba I
Apa I
T7
3418/0
Plac
lacZ'-ccdB
Pvu I (532)
stu I (879)
pUC ori
pZEr0-1:kan^r
3.40Kb
f1 ori
1322
2540
aph
Xho I (1471)
Pvu I (1869)

FIG. 18

SKH2	5' CAT ACC gTT TTC TTg TTT CCA gCC -3'
LSM13	5' gCA AgC TTA TgA TAT AgA AAT TTg TAA C -3'
N192	5' ggAAggCCATATgCTCAAAgAgATTgATgAgTCT -3'
C588	5' CCAAggATCCTTAAACCCATTCACCATTggC -3'

FIG. 19

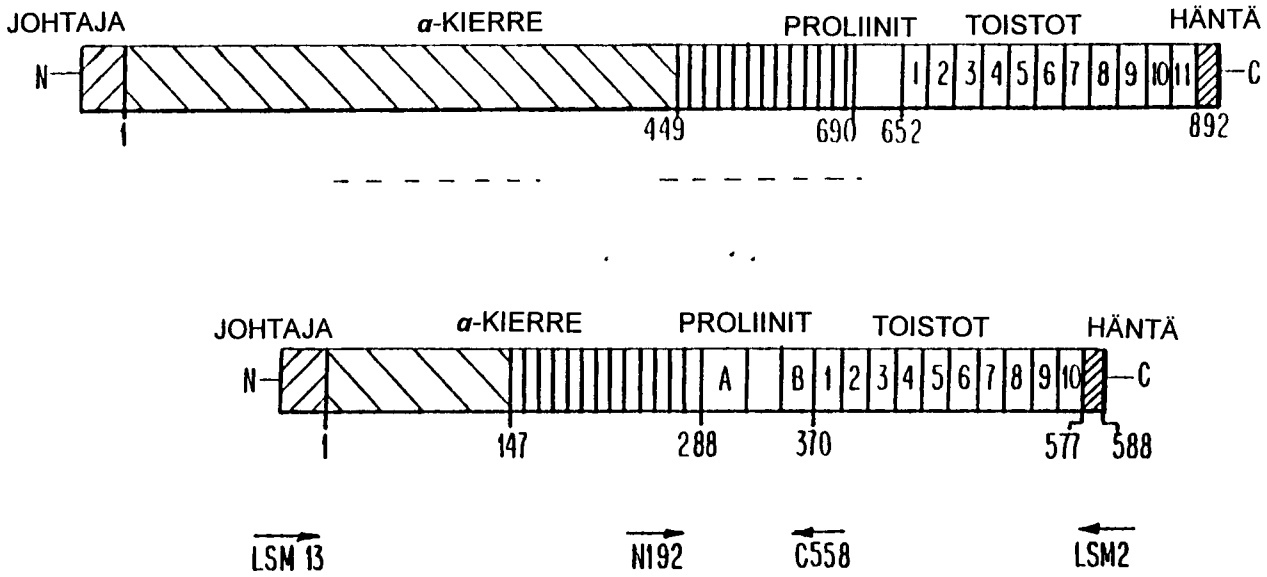

JOHTAJA
α-KIERRE
PROLIINIT
TOISTOT
HÄNTÄ
N
C
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
1
449
690
652
892
JOHTAJA
α-KIERRE
PROLIINIT
TOISTOT
HÄNTÄ
N
C
A
B
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
1
147
288
370
577
588
LSM 13
N192
C558
LSM2

FIG. 20

```
AAGCTTATGC TTGTCAATAA TCACAAATAT GTAGATCATA TCTTGTTTAG GACAGTAAAA CATCCTAATT ACTTTTTAAA   80

TATTTTACCT GAGTTGATTG GCTTGACCTT GTTGAGTCAT GCCTATATGA CTTTTGTTTT AGTTTTTCCA GTTTATGCAG  160

TTATTTTGTA TCGACGAATA GCTGAAGAGG AAAAGTTATT ACATGAAGTT ATAATCCCAA ATGGAAGCAT AAAGAGATAA  240

ATACAAAATT CGATTTATAT ACAGTTCATA TTGAAGTGAT ATAGTAAGGT TAAAGAAAAA ATAtagaagg aAATAAACAT  320
                                                                                Met>  -37

GTTTGCATCA AAAAGCGAAA GAAAAGTACA TTATTCAATT CGTAAATTTA GTATTGGAGT AGCTAGTGTA GCTGTTGCCA  400
 PheAlaSer LysSerGlu ArgLysValHis TyrSerIle ArgLysPhe SerIleGlyVal AlaSerVal AlaValAla>  -11

 GCTTGTTCTT AGGAGGAGTA GTCCATGCAG AAGGGGTTAG AAGTGGGAAT AACCTCACGG TTACATCTAG TGGGCAAGAT  480
SerLeuPheLeu GlyGlyVal ValHisAla GluGlyValArg SerGlyAsn AsnLeuThr ValThrSerSer GlyGlnAsp>  17

ATATCGAAGA AGTATGCTGA TGAAGTCGAG TCGCATCTAG AAAGTATATT GAAGGATGTC AAAAAAAATT TGAAAAAAGT  560
IleSerLys LysTyrAlaAsp GluValGlu SerHisLeu GluSerIleLeu LysAspVal LysLysAsn LeuLysLysVal>  44

TCAACATACC CAAAATGTCG GCTTAATTAC AAAGTTGAGC GAAATTAAAA AGAAGTATTT GTATGACTTA AAAGTTAATG  640
 GlnHisThr GlnAsnVal GlyLeuIleThr LysLeuSer GluIleLys LysLysTyrLeu TyrAspLeu LysValAsn>  70

 TTTTATCGGA AGCTGAGTTG ACGTCAAAAA CAAAAGAAAC AAAAGAAAAG TTAACCGCAA CTTTTGAGCA GTTTAAAAAA  720
ValLeuSerGlu AlaGluLeu ThrSerLys ThrLysGluThr LysGluLys LeuThrAla ThrPheGluGln PheLysLys>  97

GATACATTAC CAACAGAACC AGAAAAAAAG GTAGCAGAAG CTCAGAAGAA GGTTGAAGAA GCTAAGAAAA AAGCCGAGGA  800
AspThrLeu ProThrGluPro GluLysLys ValAlaGlu AlaGlnLysLys ValGluGlu AlaLysLys LysAlaGluAsp>  124
```

FIG. 21A

```
TCAAAAAGAA AAAGATCGCC GTAACTACCC AACCATTACT TACAAAACGC TTGAACTTGA AATTGCTGAG TCCGATGTGG   880
 GluLysGlu LysAspArg ArgAsnTyrPro ThrIleThr TyrLysThr LeuGluLeuGlu IleAlaGlu SerAspVal>   150

 AAGTTAAAAA AGCGGAGCTT GAACTAGTAA AAGTGAAAGC TAAGGAATCT CAAGACGAGG AAAAAATTAA GCAAGCAGAA  960
GluValLysLys AlaGluLeu GluLeuVal LysValLysAla LysGluSer GlnAspGlu GluLysIleLys GlnAlaGlu> 177

GCGGAAGTTG AGAGTAAACA AGCTGAGGCT ACAAGGTTAA AAAAAATCAA GACAGATCGT GAAGAAGCTA AACGAAAAGC  1040
AlaGluVal GluSerLysGln AlaGluAla ThrArgLeu LysLysIleLys ThrAspArg GluGluAla LysArgLysAla> 204

AGATGCTAAG TTGAAGGAAG CTGTTGAAAA GAATGTAGCG ACTTCAGAGC AAGATAAACC AAAGAGGCGG GCAAAACGAG  1120
 AspAlaLys LeuLysGlu AlaValGluLys AsnValAla ThrSerGlu GlnAspLysPro LysArgArg AlaLysArg>   230

 GAGTTTCTGG AGAGCTAGCA ACACCTGATA AAAAAGAAAA TGATGCGAAG TCTTCAGATT CTAGCGTAGG TGAAGAAACT  1200
GlyValSerGly GluLeuAla ThrProAsp LysLysGluAsn AspAlaLys SerSerAsp SerSerValGly GluGluThr> 257

CTTCCAAGCC CATCCCTTAA TATGGCAAAT GAAAGTCAGA CAGAACATAG GAAAGATGTC GATGAATATA TAAAAAAAAT  1280
LeuProSer ProSerLeuAsn MetAlaAsn GluSerGln ThrGluHisArg LysAspVal AspGluTyr IleLysLysMet> 284

GTTGAGTGAG ATCCAATTAG ATAGAAGAAA ACATACCCAA AATGTCAACT TAAACATAAA GTTGAGCGCA ATTAAAACGA  1360
 LeuSerGlu IleGlnLeu AspArgArgLys HisThrGln AsnValAsn LeuAsnIleLys LeuSerAla IleLysThr>   310

 AGTATTTGTA TGAATTAAGT GTTTTAAAAG AGAACTCGAA AAAAGAAGAG TTGACGTCAA AAACCAAAGC AGAGTTAACC  1440
LysTyrLeuTyr GluLeuSer ValLeuLys GluAsnSerLys LysGluGlu LeuThrSer LysThrLysAla GluLeuThr> 337

GCAGCTTTTG AGCAGTTTAA AAAAGATACA TTGAAACCAG AAAAAAAGGT AGCAGAAGCT GAGAAGAAGG TTGAAGAAGC  1520
AlaAlaPhe GluGlnPheLys LysAspThr LeuLysPro GluLysLysVal AlaGluAla GluLysLys ValGluGluAla> 364
```

FIG. 21B

```
TAAGAAAAAA GCCAAGGATC AAAAAGAAGA AGATCGCCGT AACTACCCAA CCAATACTTA CAAAACGCTT GAACTTGAAA   1600
 LysLysLys AlaLysAsp GlnLysGluGlu AspArgArg AsnTyrPro ThrAsnThrTyr LysThrLeu GluLeuGlu>   390

 TTGCTGAGTC CGATGTGAAA GTTAAAGAAG CGGAGCTTGA ACTAGTAAAA GAGGAAGCTA ACGAATCTCG AAACGAGGAA  1680
IleAlaGluSer AspValLys ValLysGlu AlaGluLeuGlu LeuValLys GluGluAla AsnGluSerArg AsnGluGlu> 417

AAAATTAAGC AAGCAAAAGA GAAAGTTGAG AGTAAAAAAG CTGAGGCTAC AAGGTTAGAA AAAATCAAGA CAGATCGTAA   1760
LysIleLys GlnAlaLysGlu LysValGlu SerLysLys AlaGluAlaThr ArgLeuGlu LysIleLys ThrAspArgLys> 444

AAAAGCAGAA GAAGAAGCTA AACGAAAAGC AGAAGAATCT GAGAAAAAAG CTGCTGAAGC CAAACAAAAA GTGGATGCTG   1840
 LysAlaGlu GluGluAla LysArgLysAla GluGluSer GluLysLys AlaAlaGluAla LysGlnLys ValAspAla>   470

 AAGAATATGC TCTTGAAGCT AAAATCGCTG AGTTGGAATA TGAAGTTCAG AGACTAGAAA AAGAGCTCAA AGAGATTGAT  1920
GluGluTyrAla LeuGluAla LysIleAla GluLeuGluTyr GluValGln ArgLeuGlu LysGluLeuLys GluIleAsp> 497

GAGTCTGACT CAGAAGATTA TCTTAAAGAA GGCCTCCGTG CTCCTCTTCA ATCTAAATTG GATACCAAAA AAGCTAAACT   2000
GluSerAsp SerGluAspTyr LeuLysGlu GlyLeuArg AlaProLeuGln SerLysLeu AspThrLys LysAlaLysLeu> 524

ATCAAAACTT GAAGAGTTGA GTGATAAGAT TGATGAGTTA GACGCTGAAA TTGCAAAACT TGAAGTTCAA CTTAAAGATG   2080
 SerLysLeu GluGluLeu SerAspLysIle AspGluLeu AspAlaGlu IleAlaLysLeu GluValGln LeuLysAsp>   550

 CTGAAGGAAA CAATAATGTA GAAGCCTACT TTAAAGAAGG TTTAGAGAAA ACTACTGCTG AGAAAAAAGC TGAATTAGAA  2160
AlaGluGlyAsn AsnAsnVal GluAlaTyr PheLysGluGly LeuGluLys ThrThrAla GluLysLysAla GluLeuGlu> 577

AAAGCTGAAG CTGACCTTAA GAAAGCAGTT GATGAGCCAG AAACTCCAGC TCCGGCTCCT CAACCAGCTC CAGCTCCAGA   2240
LysAlaGlu AlaAspLeuLys LysAlaVal AspGluPro GluThrProAla ProAlaPro GlnProAla ProAlaProGlu> 604
```

FIG. 21C

```
AAAACCAGCT GAAAAACCAG CTCCAGCTCC AGAAAAACCA GCTCCAGCTC CAGAAAAACC AGCTCCAGCT CCAGAAAAAC   2320
 LysProAla GluLysPro AlaProAlaPro GluLysPro AlaProAla ProGluLysPro AlaProAla ProGluLys>   630

 CAGCTCCAGC TCCAGAAAAA CCAGCTCCAG CTCCAGAAAA ACCAGCTCCA ACTCCAGAAA CTCCAAAAAC AGGCTGGAAA   2400
ProAlaProAla ProGluLys ProAlaPro AlaProGluLys ProAlaPro ThrProGlu ThrProLysThr GlyTrpLys>  657

CAAGAAAACG GTATGTGGTA CTTCTACAAT ACTGATGGTT CAATGGCAAC AGGCTGGCTC CAAAACAATG GCTCATGGTA   2480
GlnGluAsn GlyMetTrpTyr PheTyrAsn ThrAspGly SerMetAlaThr GlyTrpLeu GlnAsnAsn GlySerTrpTyr>  684

CTACCTCAAC AGCAATGGCG CTATGGCGAC AGGATGGCTC CAAAACAATG GCTCATGGTA CTACCTCAAC AGCAATGGCG   2560
 TyrLeuAsn SerAsnGly AlaMetAlaThr GlyTrpLeu GlnAsnAsn GlySerTrpTyr TyrLeuAsn SerAsnGly>   710

 CTATGGCGAC AGGATGGCTC CAATACAATG GTTCATGGTA CTACCTCAAC GCTAATGGTG ATATGGCGAC AGGATGGCTC   2640
AlaMetAlaThr GlyTrpLeu GlnTyrAsn GlySerTrpTyr TyrLeuAsn AlaAsnGly AspMetAlaThr GlyTrpLeu>  737

CAATACAATG GTTCATGGTA CTACCTCAAC GCTAATGGTG ATATGGCGAC AGGATGGTTC CAATACAATG GTTCATGGTA   2720
GlnTyrAsn GlySerTrpTyr TyrLeuAsn AlaAsnGly AspMetAlaThr GlyTrpPhe GlnTyrAsn GlySerTrpTyr>  764

CTACCTCAAC GCTAATGGTG ATATGGCGAC AGGATGGTTC CAATACAATG GTTCATGGTA CTACCTCAAC GCTAATGGTG   2800
 TyrLeuAsn AlaAsnGly AspMetAlaThr GlyTrpPhe GlnTyrAsn GlySerTrpTyr TyrLeuAsn AlaAsnGly>   790

 ATATGGCGAC AGGATGGCTC CAATACAATG GTTCATGGTA CTACCTAAAC AGCAATGGTG CTATGGTAAC AGGATGGCTC   2880
AspMetAlaThr GlyTrpLeu GlnTyrAsn GlySerTrpTyr TyrLeuAsn SerAsnGly AlaMetValThr GlyTrpLeu>  817

CAAAACAATG GCTCATGGTA CTACCTAAAC GCTAACGGTT CAATGGCAAC AGATTGGGTG AAAGATGGAG ATACCTGGTA   2960
GlnAsnAsn GlySerTrpTyr TyrLeuAsn AlaAsnGly SerMetAlaThr AspTrpVal LysAspGly AspThrTrpTyr>  844
```

FIG. 21D

```
CTATCTTGAA GCATCAGGTG CTATGAAAGC AAGCCAATGG TTCAAAGTAT CAGATAAATG GTACTATGTC AATGGCTCAG   3040
 TyrLeuGlu AlaSerGly AlaMetLysAla SerGlnTrp PheLysVal SerAspLysTrp TyrTyrVal AsnGlySer>   870

 GTGCCCTTGC AGTCAACACA ACTGTAGATA GCTATAGAGT CAATGCCAAT GGTGAATGGG TAAACTAAAC TTAATATAAC
GlyAlaLeuAla ValAsnThr ThrValAsp SerTyrArgVal AsnAlaAsn GlyGluTrp ValAsn>                 892

TAGTTAATAC TGACTTCCTG TAAGAACTCT TTAAAGTATT CCCTACAAAT ACCATATCCT TTCAGTAGAT AATATACCCT   3200

TGTAGGAAGT TTAGATTAAA AAATAACTCT GTAATCTCTA GCCGGATTTA TAGCGCTAGA GACTACGGAG TTTTTTTGAT   3280

GAGGAAAGAA TGGCGGCATT CAAGAGACTC TTTAAGAGAG TTACGGGTTT TAAACTATTA AGCTTTCTCC AATTGCAAGA   3360

GGGCTTCAAT CTCTGCTAGG TGCTAGCTTG CGAAATGGCT CCCACGGAGT TTGGCRGCGC CAGATGTTCC ACGGAGGTAG   3440

TGAGGAGCGA GGCCGCGGAA TTC
```

FIG. 21E

```
249 SDSSVGEETLPSPSLNMANESQTEHRKDVDEYIKKMLSEIQLDRRKHTQN 298
    .:|.|:.:. :....: |.....: :|.|::  .| |.: . ..:|..::
  1 EESPVASQSKAEKDYDAAKKDAKNAKKAVED.AQKALDDAKAAQKKYDED 49
            .         .         .         .         .
299 VNLNIKLSAIKTKYLYELSVLKENSKKEELTSKTKAELTAAFEQFKKDTL 348
     . . . .|:            |.. .||: .|. |.: .|: .:...|
 50 QKKTEEKAAL............EKAASEEM.DKAVAAVQQAYLAYQQATD 86
            .         .         .         .         .
349 KPEKKVAEAEKKVEEAKKKAKDQKEEDRRNYPTNTYKTLELEIAESDVKV 398
    |:.|  ..|:|.::||||:..:.|..       || :.: :
 87 KAAK..DAADKMIDEAKKREEEAKTK......FNTVRAMVV......... 119
            .         .         .         .         .
399 KEAELELVKEEANESRNEEKIKQAKEKVESKKAEATRLEKIKTDRKKAEE 448
                  .:.|.: :.|.| |. |..|. |       .|  |
120 ...............PEPEQLAETKKKSEEAKQKAPEL.......TKKLE 147
            .         .         .         .         .
449 EAKRKAEESEKKAAEAKQKVDAEEYALEAKIAELEYEVQRLEKELKEIDE 498
    ||| | ||.||||.||||||||||| | :||||||| :|:|||.|||||||
148 EAKAKLEEAEKKATEAKQKVDAEEVAPQAKIAELENQVHRLEQELKEIDE 197
```

FIG. 22A

```
                 .         .         .         .         .
499 SDSEDYLKEGLRAPLQSKLDTKKAKLSKLEELSDKIDELDAEIAKLEVQL 548
    |:|||| |||:|||||||||.||||||||||||||||||||||||| ||
198 SESEDYAKEGFRAPLQSKLDAKKAKLSKLEELSDKIDELDAEIAKLEDQL 247

                 .         .         .         .         .
549 KDAEGNNNVEAYFKEGLEKTTAEKKAELEKAEADLKKAVDEPETPAPAPQ 598
    |.||:|||||.|||||||||.|.|||||||.||||||||:|||.|||||:
248 KAAEENNNVEDYFKEGLEKTIAAKKAELEKTEADLKKAVNEPEKPAPAPE 297

                 .         .         .         .         .
599 PAPAPEKPAE..KPAPAPEK.PAPAPEKPA..PAPEKPAPA......... 634
     .|||| |||  ||||||:. ||| |||||  | |||....
298 .TPAPEAPAEQPKPAPAPQPAPAPKPEKPAEQPKPEKTDDQQAEEDYARR 346

                 .         .         .         .         .
635 ........PEKPAPAPEKPAPTPETPKTGWKQENGMWYFYNTDGSMATGW 676
            .:..:| :|||||   .|||||||||||||||||||
347 SEEEYNRLTQQQPPKAEKPAP...APKTGWKQENGMWYFYNTDGS..... 388

                 .         .         .         .         .
677 LQNNGSWYYLNSNGAMATGWLQNNGSWYYLNSNGAMATGWLQYNGSWYYL 726
                 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
389 ...............MATGWLQNNGSWYYLNSNGAMATGWLQYNGSWYYL 423
```

FIG. 22B

```
                .         .         .         .         .
727 NANGDMATGWLQYNGSWYYLNANGDMATGWFQYNGSWYYLNANGDMATGW 776
    ||||.||||| . ||||||||||.|||||:||||||||||||||.|||||
424 NANGAMATGWAKVNGSWYYLNANGAMATGWLQYNGSWYYLNANGAMATGW 473

                .         .         .         .         .
777 FQYNGSWYYLNANGDMATGWLQYNGSWYYLNSNGAMVTGWLQNNGSWYYL 826
     . ||||||||||.||||||||||||||||.||||.||| . |||||||
474 AKVNGSWYYLNANGAMATGWLQYNGSWYYLNANGAMATGWAKVNGSWYYL 523

                .         .         .         .         .
827 NANGSMATDWVKDGDTWYYLEASGAMKASQWFKVSDKWYYVNGSGALAVN 876
    ||||.|||:||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||
524 NANGAMATGWVKDGDTWYYLEASGAMKASQWFKVSDKWYYVNGLGALAVN 573

                .
877 TTVDSYRVNANGEWV 891
    ||||:|:||||||||
574 TTVDGYKVNANGEWV 588
```

FIG. 22C

	a	b	c	d	e	f	g	
1								Glu Gly Val Arg Ser Gly Asn Asn Leu Thr
11								Val Thr Ser Ser Gly
16		Gln	Asp	Ile	Ser	Lys	Lys	
22	Tyr	Ala	Asp	Glu	Val	Glu	Ser	
29			His	Leu	Glu	Ser	Ile	
34	Leu	Lys	Asp	Val	Lys	Lys	Asn	
41	Leu	Lys	Lys					
44	Val	Gln	His	Thr	Gln	Asn	Val	
51			Gly	Leu	Ile	Thr	Lys	
56	Leu	Ser	Glu	Ile	Lys	Lys	Lys	
63							Tyr	
64	Leu	Tyr	Asp	Leu	Lys			
69	Val	Asn	Val	Leu	Ser	Glu	Ala	
76			Glu	Leu	Thr	Ser	Lys	
81				Thr	Lys	Glu	Thr	
85	Lys	Glu	Lys	Leu	Thr	Ala	Thr	
92	Phe	Glu	Gln	Phe	Lys	Lys	Asp	
99								Thr Leu Pro Thr Glu Pro
105					Glu	Lys	Lys	
108	Val	Ala	Glu	Ala	Gln	Lys	Lys	
115	Val	Glu	Glu	Ala	Lys	Lys	Lys	

FIG. 23A

122				Ala	Glu	Asp	Gln			
126	Lys	Glu	Lys	Asp	Arg	Arg	Asn			
133	Tyr	Pro	Thr	Ile	Thr					
138	Tyr	Lys	Thr	Leu	Glu	Leu	Glu			
145	Ile	Ala	Glu	Ser	Asp	Val	Glu			
152	Val	Lys	Lys	Ala	Glu	Leu	Glu			
159	Leu	Val	Lys	Val	Lys	Ala	Lys			
166	Glu	Ser	Gln	Asp	Glu	Glu	Lys			
173	Ile	Lys	Gln	Ala	Glu	Ala	Glu			
180	Val	Glu	Ser	Lys	Gln	Ala	Glu			
187				Ala	Thr	Arg				
190	Leu	Lys	Lys	Ile	Lys	Thr	Asp			
197	Arg	Glu	Glu	Ala	Lys	Arg	Lys			
204		Ala	Asp	Ala	Lys	Leu	Lys			
210		Glu	Ala	Val	Glu	Lys	Asn			
216	Val	Ala	Thr	Ser	Glu	Gln	Asp			
223	Lys									
224								Pro	Lys	Arg
234								Gly	Glu	Leu
244								Asn	Asp	Ala
254										

224	Arg	Ala	Lys	Arg	Gly	Val	Ser		
234	Ala	Thr	Pro	Asp	Lys	Lys	Glu		
244	Lys	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Val		

FIG. 23B

									Gly	Glu	Glu	Thr	Leu	Pro	Ser	Pro	Ser	Leu
264									Asn	Met	Ala	Asn						
268						Glu	Ser	Gln										
271		Thr	Glu	His		Arg	Lys	Asp										
277	Val	Asp	Glu	Tyr														
281	Ile	Lys	Lys	Met		Leu	Ser	Glu										
288	Ile	Gln	Leu	Asp		Arg	Arg	Lys										
295			His	Thr		Gln	Asn	Val										
300			Asn	Leu		Asn	Ile	Lys										
305	Leu	Ser	Ala	Ile		Lys	Thr	Lys										
312				Tyr		Leu	Tyr	Glu										
316	Leu	Ser	Val	Leu		Lys	Glu	Asn										
323							Ser	Lys										
325	Lys	Glu	Glu	Leu		Thr	Ser	Lys										
332				Thr		Lys	Ala	Glu										
336	Leu	Thr	Ala	Ala		Phe	Glu	Gln										
343	Phe	Lys	Lys															
346									Asp	Thr	Leu	Lys	Pro					
351						Glu	Lys	Lys										
354	Val	Ala	Glu	Ala		Glu	Lys	Lys										
361	Val	Glu	Glu	Ala		Lys	Lys	Lys										
368				Ala		Lys	Asp	Gln										
372	Lys	Glu	Glu	Asp		Arg	Arg	Asn										

FIG. 23C

379				Tyr			
380				Pro	Thr	Asn	Thr
384	Tyr	Lys	Thr	Leu	Glu	Leu	Glu
391	Ile	Ala	Glu	Ser	Asp	Val	Lys
398	Val	Lys	Glu	Ala	Glu		
403	Leu	Glu	Leu	Val	Lys	Glu	Glu
410	Ala	Asn	Glu	Ser	Arg	Asn	Glu
417		Glu	Lys	Ile	Lys	Gln	Ala
423	Lys	Glu	Lys	Val	Glu	Ser	Lys
430	Lys	Ala	Glu	Ala	Thr	Arg	
436	Leu	Glu	Lys	Ile	Lys	Thr	Asp
443	Arg	Lys	Lys	Ala	Glu	Glu	Glu
450				Ala	Lys	Arg	Lys
454	Ala	Glu	Glu	Ser	Glu	Lys	Lys
461	Ala	Ala	Glu	Ala	Lys	Gln	Lys
468	Val	Asp	Ala	Glu	Glu	Tyr	Ala
475				Leu	Glu	Ala	Lys
479	Ile	Ala	Glu	Leu	Glu	Tyr	Glu
486	Val	Gln	Arg	Leu	Glu	Lys	Glu

FIG. 23D

493	Leu	Lys	Glu				
496	Ile	Asp	Glu	Ser	Asp	Ser	Glu
503		Asp	Tyr	Leu	Lys	Glu	Gly
509	Leu	Arg	Ala				
512			Pro	Leu	Gln	Ser	Lys
517	Leu	Asp	Thr	Lys	Lys	Ala	Lys
524	Leu	Ser	Lys				
527	Leu	Glu	Glu	Leu	Ser	Asp	Lys
534	Ile	Asp	Glu	Leu	Asp	Ala	Glu
541	Ile	Ala	Lys	Leu	Glu	Val	Gln
548	Leu	Lys	Asp	Ala	Glu	Gly	Asn
555						Asn	Asn
557	Val	Glu	Ala	Tyr	Phe	Lys	Glu
564			Gly	Leu	Glu	Lys	Thr
569			Thr	Ala	Glu	Lys	Lys
574		Ala	Glu	Leu	Glu	Lys	Ala
580	Glu	Ala	Asp	Leu	Lys	Lys	Ala
587	Val	Asp	Glu				

FIG. 23E

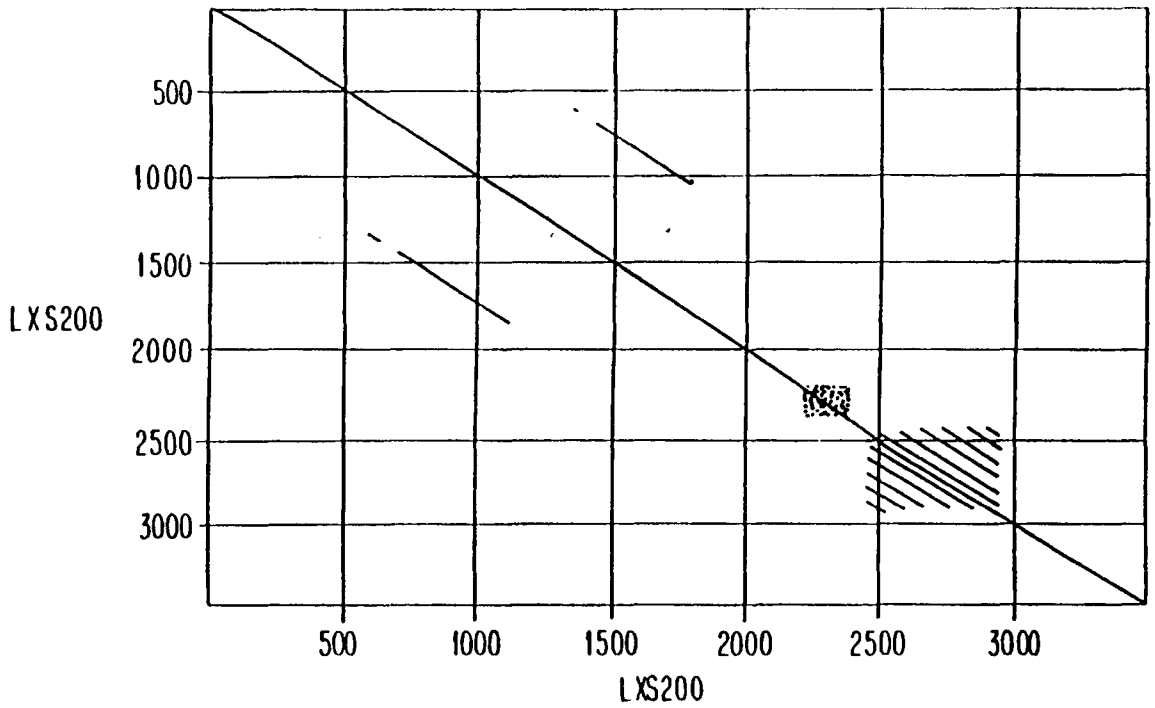

500
1000
1500
2000
2500
3000
LXS200
500
1000
1500
2000
2500
3000
LXS200

FIG. 24

```
  1  CCAAGCTATT AGGTGACACT ATAGAATACT CAAGCTATGC ATCAAGCTTA
 51  TGCTTGTCAA TAATCACAAA TATGTAGATC ATATCTTGTT TAGGACAGTA
101  AAACATCCTA ATTACTTTTT AAATATTCTT CCTGAGTTGA TTGGCTTGAC
151  CTTGTTGAGT CATGCTTATG TGACTTTTGT TTTAGTTTTT CCAGTTTATG
201  CAGTTATTTT GTATCGACGA ATAGCTGAAG AGGAAAAGCT ATTACATGAA
251  GTTATAATCC CAAATGGAAG CATAAAGAGA TAAATACAAA ATTCGATTTA
301  TATACAGTTC ATATTGAAGT AATATAGTAA GGTTAAAGAA AAAATATAGA
351  AGGAAATAAA CATGTTTGCA TCAAAAAGCG AAAGAAAAGT ACATTATTCA
401  ATTCGTAAAT TTAGTATTGG AGTANCTAGT GTAGCTGTTG CCAGTCTTGT
451  TATGGGAAGT GTGGTTCATG CSACCAGARA AACGARGGAA GTACCCAAGC
```

FIG. 25A

501 AGCCMCTTCT TCTAATATGG CAAAGACAGA ACATAGGAAA GCYGCTAAAC

551 MAGTCGTCGA TGAATATATA GAAAAAATGT TGAGGGAGAT TCAACTAGAT

601 AGAAGAAAAC ATACCCAAAA TGTCGCCTTA AACATAAAGT TGAGCGCAAT

651 TANAACGAAG TATTTGCGTG AATTAANTGT TNTAGAAGAG AAGTCGAANN

701 ATGAGTTGCC GTCAGAAATA AAAGCGAAGT TAGACGCCGC TTTTGANAAG

751 TTTAAAAAAG ATACATTGAA ACCAGGAGAA AAGGTAGCNG AAGCTAAGAA

801 GAANGTTGAA GAAGCTAAGA AWAAAGCCRA GGATCAAAAA GAAGAAGATC

851 GYCGTAACTA CCCAACCAAT ACTTRCAAAA CGCTTGACCT TGAAATTGCT

901 GAGTYCGATG TGAAAGTTAA AGAAGCGGAG CTTGAACTAG TAAARGAGGA

FIG. 25B

951 AGCTMMRGAA YCTCGAGACG AGGAAAAAAT TAAGCAAGCA AAAGCGAAAG

1001 TTGAGAGTAA AAAAGCTGAG GCTACAAGGT TAGAAAACAT CAAGACAGAT

1051 NGTAAAAAAG CAGAAGAAGA AGNTAAACGA AAAGCAGCAG AAGAAGATAA

1101 AGTTAAAGAA AAACCAGCTG AACAACCACA ACCAGCGCCG GNTACTCAAC

1151 CAGAAAAACC AGCTCCAAAA CCAGAGAAGC CAGCTGAACA ACCAAAAGCA

1201 GAAAAAACAG ATGATCAACA AGCTGAAGAA GACTATGCTC GTAGATCAGA

1251 AGAAGAATAT AATCGCTTGA NTCAACAGCA ACCGCCAAAA ACTGAAAAAC

1301 CAGCACAACC ATNTACTCCA AAAACA

FIG.25C

```
                .         .         .         .         .
 875 AAAAAGCTAAACTATCAAAACTTGAAGAGTTAAGTGATAAGATTGATGAG 924
     |||| |||  ||  | |||  ||| .||||:   ||  ||  || | ||
 877 AAAACGCTTGACCTTGAAA..TTGCTGAGTYCGATGTGAAAGTTAAAGAA 924
                .         .         .         .         .
 925 TTAGACGCTGAAATTGCAAAACTTGAAGATCAACTTAAAGCTGCTGAAGA 974
        ||   |||| | | |||:   |||| |:::          |  || ||
 925 GCGGAGCTTGAACTAGTAAARGAGGAAGCTMMRGAAYCTCGAGACGAGGA 974
                .         .         .         .         .
 975 AAACAATAATGTAGAAGACTACTTTAAAGAAGGTTTAGAGAAAACTATTG 1024
     ||| | |||   || | |        |  ||| ||| ||||
 975 AAAAATTAAGCAAGCAAA.......AGCGAAAGTTGAGAG.......... 1007
                .         .         .         .         .
1025 CTGCTAAAAAAGCTGA.........ATTAGAAAAAACTGAAGCTGACCTT 1065
         |||||||||||          |||||||| |   |  | || : |
1008 ....TAAAAAAGCTGAGGCTACAAGGTTAGAAAACATCAAGACAGATNGT 1053
```

FIG. 26A

```
                 .         .         .         .         .
1066 AAGAAAGCAGTTAATGAGCCAGAAAAACCAGCTCCAGCTCCAGAAACTCC 1115
     || |||||||   | ||   ||: |||| |    ||||   ||||  |
1054 AAAAAAGCAG...AAGAAGAAGNTAAACGAAAAGCAGCAGAAGAAGATAA 1100

                 .         .         .         .         .
1116 AGCCCCAGAAGCACCAGCTGAACAACCAAAACCAGCGCCGGCTCCTCAAC 1165
     ||    ||||  |||||||||||||||| ||||||||||||:| ||||||
1101 AGTTAAAGAAAAACCAGCTGAACAACCACAACCAGCGCCGGNTACTCAAC 1150

                 .         .         .         .         .
1166 CAG...CTCCCGCACCAAAACCAGAGAAGCCAGCTGAACAACCAAAACCA 1212
     |||     || || |||||||||||||||||||||||||||||||| ||
1151 CAGAAAAACCAGCTCCAAAACCAGAGAAGCCAGCTGAACAACCAAAAGCA 1200

                 .         .         .         .         .
1213 GAAAAAACAGATGATCAACAAGCTGAAGAAGACTATGCTCGTAGATCAGA 1262
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1201 GAAAAAACAGATGATCAACAAGCTGAAGAAGACTATGCTCGTAGATCAGA 1250

                 .         .         .         .         .
1263 AGAAGAATATAATCGCTTGACTCAACAGCAACCGCCAAAAGCTGAAAAAC 1312
     ||||||||||||||||||||:||||||||||||||||||| |||||||||
1251 AGAAGAATATAATCGCTTGANTCAACAGCAACCGCCAAAAACTGAAAAAC 1300

                 .         .
1313 CAGCTC......CTGCACCAAAAACA 1332
     |||| |      :| | |||||||||
1301 CAGCACAACCATNTACTCCAAAAACA 1326
```

FIG. 26B

```
                 .         .         .         .         .
  1 AAGCTTATGCTTGTCAATAATCACAAATATGTAGATCATATCTTGTTTAG 50
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 44 AAGCTTATGCTTGTCAATAATCACAAATATGTAGATCATATCTTGTTTAG 93

                 .         .         .         .         .
 51 GACAGTAAAACATCCTAATTACTTTTTAAATATTTTACCTGAGTTGATTG 100
    |||||||||||||||||||||||||||||||||| | ||||||||||||||
 94 GACAGTAAAACATCCTAATTACTTTTTAAATATTCTTCCTGAGTTGATTG 143

                 .         .         .         .         .
101 GCTTGACCTTGTTGAGTCATGCCTATATGACTTTTGTTTTAGTTTTTCCA 150
    |||||||||||||||||||||||| ||| ||||||||||||||||||||||
144 GCTTGACCTTGTTGAGTCATGCTTATGTGACTTTTGTTTTAGTTTTTCCA 193

                 .         .         .         .         .
151 GTTTATGCAGTTATTTTGTATCGACGAATAGCTGAAGAGGAAAAGTTATT 200
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||
194 GTTTATGCAGTTATTTTGTATCGACGAATAGCTGAAGAGGAAAAGCTATT 243
```

FIG. 27A

```
                 .         .         .         .         .
201 ACATGAAGTTATAATCCCAAATGGAAGCATAAAGAGATAAATACAAAATT 250
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
244 ACATGAAGTTATAATCCCAAATGGAAGCATAAAGAGATAAATACAAAATT 293

                 .         .         .         .         .
251 CGATTTATATACAGTTCATATTGAAGTGATATAGTAAGGTTAAAGAAAAA 300
    |||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||
294 CGATTTATATACAGTTCATATTGAAGTAATATAGTAAGGTTAAAGAAAAA 343

                 .         .         .         .         .
301 ATATAGAAGGAAATAAACATGTTTGCATCAAAAAGCGAAAGAAAAGTACA 350
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
344 ATATAGAAGGAAATAAACATGTTTGCATCAAAAAGCGAAAGAAAAGTACA 393

                 .         .         .         .         .
351 TTATTCAATTCGTAAATTTAGTATTGGAGTAGCTAGTGTAGCTGTTGCCA 400
    ||||||||||||||||||||||||||||:||||||||||||||||||||
394 TTATTCAATTCGTAAATTTAGTATTGGAGTANCTAGTGTAGCTGTTGCCA 443

                 .         .         .         .         .
401 GCTTGTTCTTAGGAGGAGTAGTCCATGCAGAAGGGGTTAGAAGTGGGAAT 450
    |  |  |  | ||| | || || |||||   |   |  | | | :||||
444 GTCTTGTTATGGGAAGTGTGGTTCATGC..SACCAGARAAACGARGGAAG 491

                 .         .         .         .         .
451 AACCTCA....CGGTTACATCTAGTGGGCAAGATATATCGAAGAAGTATG 496
     |||  |    |   | | |||| |  |  | | | |    | | | | |
492 TACCCAAGCAGCCMCTTCTTCTAATATGGCAAAGACAGAACATAGGAAAG 541
```

FIG. 27B

```
                 .         .         .         .         .
497 CTGATGAA......GTCGAGTCGCATCTAGAAAGTATATTGAAGGATGTC 540
    |:| | ||      |||||     || ||||||  || |||| |||  |
542 CYGCTAAACMAGTCGTCGATGAATATATAGAAAAAATGTTGAGGGAGATT 591

                 .         .         .         .         .
541 AAAAAAAATTTGAAAAAAGTTCAACATACCCAAAATGTCGGCTTAATTAC 590
     ||  | ||   | ||      |||||||||||||||||| |||||  |
592 CAACTAGATAGAAGAA......AACATACCCAAAATGTCGCCTTAAACAT 635

                 .         .         .         .         .
591 AAAGTTGAGCGAAATTAAAAAGAAGTATTTGTATGACTTAAAAGTTA... 637
    |||||||||||| |||||:|| ||||||||||  ||| ||||: |||:
636 AAAGTTGAGCGCAATTANAACGAAGTATTTGCGTGAATTAANTGTTNTAG 685

                 .         .         .         .         .
638 ATGTTTTATCGGAAGCTGAGTTGACGTCAAAAACAAAAGAAACAAAAGAA 687
    | |     ||| |:: ||||||| ||||          ||||| |||||
686 AAGAGAAGTCGAANNATGAGTTGCCGTC.........AGAAATAAAAGCG 726

                 .         .         .         .         .
688 AAGTTAACCGCAACTTTTGAGCAGTTTAAAAAAGATACATTACCAACAGA 737
    ||||||  |||  |||||||: ||||||||||||||||||        |
727 AAGTTAGACGCCGCTTTTGANAAGTTTAAAAAAGATACATT......GAA 770

                 .         .         .         .         .
738 ACCAGAAAAAAAGGTAGCAGAAGCTCAGAAGAAGGTTGAAGAAGCTAAGA 787
    ||||| | ||||||||||:|||||| |||||||:||||||||||||||||
771 ACCAGGAGAAAAGGTAGCNGAAGCTAAGAAGAANGTTGAAGAAGCTAAGA 820
```

FIG.27C

```
                 .         .         .         .         .
 788 AAAAAGCCGAGGATCAAAAAGAAAAAGATCGCCGTAACTACCCAACCATT 837
     |:||||||:||||||||||||||| |||||||:||||||||||||||||| |
 821 AWAAAGCCRAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGYCGTAACTACCCAACCAAT 870

                 .         .         .         .         .
 838 ACTTACAAAACGCTTGAACTTGAAATTGCTGAGTCCGATGTGGAAGTTAA 887
     ||||:||||||||||||| |||||||||||||||||:||||||| |||||||
 871 ACTTRCAAAACGCTTGACCTTGAAATTGCTGAGTYCGATGTGAAAGTTAA 920

                 .         .         .         .         .
 888 AAAAGCGGAGCTTGAACTAGTAAAAGTGAAAGCTAAGGAATCTCAAGACG 937
     | |||||||||||||||||||||||:| | |||||:::|||:||| |||||
 921 AGAAGCGGAGCTTGAACTAGTAAARGAGGAAGCTMMRGAAYCTCGAGACG 970

                 .         .         .         .         .
 938 AGGAAAAAATTAAGCAAGCAGAAGCGGAAGTTGAGAGTAAACAAGCTGAG 987
     |||||||||||||||||||||| ||||| ||||||||||||||| ||||||||
 971 AGGAAAAAATTAAGCAAGCAAAAGCGAAAGTTGAGAGTAAAAAAGCTGAG 1020

                 .         .         .         .         .
 988 GCTACAAGGTTAAAAAAAATCAAGACAGATCGT.............GAAGA 1025
     ||||||||||||| |||| |||||||||||||:||             |||||
1021 GCTACAAGGTTAGAAAACATCAAGACAGATNGTAAAAAAGCAGAAGAAGA 1070

                 .
1026 AGCTAAACGAAAAGCAG 1042
     ||:||||||||||||||
1071 AGNTAAACGAAAAGCAG 1087
```

FIG. 27D

```
                .         .         .         .         .
306 SQTEHRKD....VDEYIKKMLSEIQLDRRKHTQNVNLNIKLSAIKTKYLY 351
    ..|||||.    |||||.|||.|||||||||||||.|||||||| ||||
  2 AKTEHRKAAKXVVDEYIEKMLREIQLDRRKHTQNVALNIKLSAIXTKYLR 51

                .         .         .         .         .
352 ELSVLKENSKKEELTSKTKAELTAAFEQFKKDTLKPEKKVAEAEKKVEEA 401
    || | .|.|   ||.|..||.|.||| .||||||||:.|||||.| ||||
 52 ELXVXEEKS.XXELPSEIKAKLDAAFXKFKKDTLKPGEKVAEAKKXVEEA 100

                .         .         .         .         .
402 KKKAKDQKEEDRRNYPTNTYKTLELEIAESDVKVKEAELELVKEEANESR 451
    | || |||||||||||||| |||:||||| |||||||||||||||| | |
101 KXKAXDQKEEDRRNYPTNTXKTLDLEIAEXDVKVKEAELELVKEEAXEXR 150
```

FIG. 28A

```
                .         .         .         .         .
452 NEEKIKQAKEKVESKKAEATRLEKIKTDRKKAEEEAKRKAEESEKKAAEA 501
    :||||||||.||||||||||||||.|||| |||||| ||||.|.:|
151 DEEKIKQAKAKVESKKAEATRLENIKTDXKKAEEEXKRKAAEEDK..... 195
                                  .
                                  .
                                  .
                .         .         .         .         .
552 SKLDTKKAKLSKLEELSDKIDELDAEIAKLEVQLKDAEGNNNVEAYFKEG 601
                                      |. |.||.
196 ............................VKEKPAEQ........... 203
                .         .         .         .         .
602 LEKTTAEKKAELEKAEADLKKAVDEPETPAPAPQPAPAPEKPAEKPAPAP 651
                              .:|.. ..:..||| ||||||.| :..
204 .......................PQPAPXTQPEKPAPKPEKPAEQPKAEK 230
                .         .         .         .
652 EKPAPAPEKPAPAPEKP.APAPEKPAPAPEKPAPTPETPKT 691
    .....|.|. |. .|.. ..  :..:| .||||. | ||||
231 TDDQQAEEDYARRSEEEYNRLXQQQPPKTEKPAQ.PXTPKT 270
```

FIG. 28B

```
                .         .         .         .         .
 91 AKKDAKNAKKAVEDAQKALDDAKAAQKKYDEDQKKTEEKAALEKAASEEM 140
    ||.: :.| | | |     :  .   :..: |.:| .:..||:   |.
  2 AKTEHRKAAKXVVD.....EYIEKMLREIQLDRRKHTQNVALNIKLSAIX 46
                .         .         .         .         .
141 DKAVAAVQQAYLAYQQATDKAAKDAADKMIDEAKKREEEAKTKFNTVRAM 190
    .|          | ..    ....  .: .| | : :.|  ||   :
 47 TK...........YLRELXVXEEKSXXELPSEIKAKLDAAFXKF...KKD 82
                .         .         .         .         .
191 VVPEPEQLAETKKKSEEAKQKAPELTKKLEEAKAKLEEAEKKATEAKQKV 240
    .:...|.:||.||  |||| || :         .| |:  . :|:. ..:
 83 TLKPGEKVAEAKKXVEEAKXKAXD........QKEEDRRNYPTNTXKTL 123
```

FIG. 29A

```
                .         .         .         .         .
241 DAEEVAPQAKIAELENQVHRLEQELKEIDESESEDYAKEGFRAPLQSKLD 290
    | | .. :.|: | | ::  :.:|  |  :.|. . ||        .|::
124 DLEIAEXDVKVKEAELEL..VKEEAXEXRDEEKIKQAK........AKVE 163
                .         .         .         .         .
291 AKKAKLSKLEELSDKIDELDAEIAKLEDQLKAAEENNNVEDYFKEGLEKT 340
    .|||. .:||::
164 SKKAEATRLENI..................................... 175
                .         .         .         .         .
341 IAAKKAELEKTEADLKKAVNEPEKPAPAPETPAPEAPAEQPKPAPAPQPA 390
        |.: .|.|.: |: ..|.:|        ..| |||||.||| .||.
176 ....KTDXKKAEEEXKRKAAEEDK........VKEKPAEQPQPAPXTQPE 213
                .         .         .         .         .
391 .PAPKPEKPAEQPKPEKTDDQQAEEDYARRSEEEYNRLTQQQPPKAEKPA 439
     |||||||||||||:||||||||||||||||||||||| ||||||.||||
214 KPAPKPEKPAEQPKAEKTDDQQAEEDYARRSEEEYNRLXQQQPPKTEKPA 263

440 PA..PKT 444
    .:  |||
264 QPXTPKT 270
```

FIG. 29B