



F1000110060B



SUOMI – FINLAND (FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU PATENTSKRIFT

(10) FI 110060 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

29.11.2002

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

A61K 39/245, 39/395, C12N 7/01, 15/38
C12Q 1/70, G01N 33/569

(21) Patenttihakemus - Patentansökning

935459

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

07.12.1993

(24) Alkupaivä - Löpdag

05.06.1992

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

07.02.1994

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/NL92/00097

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

07.06.1991 NL 9100989 P

(73) Haltija - Innehavare

1 •Stichting Centraal Diergeneeskundig, Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, ALANKOMAAT, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Rijsewijk,Franciscus Antonius Maria, Spiegelgracht 19, 1017 JP Amsterdam, ALANKOMAAT, (NL)

2 •van Oirschot,Johannes Theodorus, Oostrandpark 18, 8212 AN Lelystad, ALANKOMAAT, (NL)

3 •Maes,Roger Kamiel, 2476 Arrowhead, Okemos, MI 48864, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Tampereen Patenttitoimisto Oy
Hermiankatu 12 B, 33720 Tampere

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä rokotekoostumuksen saamiseksi eläinten rokottamiseksi niiden suojaamiseksi BHV-1-virusta vastaan
Förfarande för att åstadkomma en vaccinsammansättning för vaccinering av djur för att skydda dem mot BHV-1-virus

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 326127 (C 12N 7/04), WO A 8910965 (C 12N 15/00), Journal of Virology vol. 61 (1987) pp 600-603 Neidhardt et al.
The Journal of General Virology vol. 70 (1989) pp 2157-2162 Chatterjee et al

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee naudan herpesvirus 1-tyyppin häviämämutanttia, jossa on häviämä glykoproteiinin gE geenissä. Mutantissa saattaa lisäksi olla häviämä tymidiinikinaasigeenissä ja/tai glykoproteiinin gI geenissä, tai heterologisen geenin liitännäinen. Keksintö koskee myös rekombinoitua nukleiinihappoa, joka käsittää gE-geenin tai sen osan. Keksintö koskee edelleen glykoproteiinia gE, siihen perustuvia peptideja ja glykoproteiinien gE ja gI komplekseja, sekä näiden vasta-aineita. Keksintö koskee lisäksi rokotevalmisteita ja diagnostisia välineistöjä, jotka käsittävät jonkin näistä materiaaleista.

Uppfinningen avser en deletionsmutant av nötkreaturens herpesvirus typ 1, som har en deletion i genen för glykoprotein gE. Mutanten kan ytterligare ha en deletion i tymidinkinas-genen och/eller genen för glykoprotein gI, eller ett inlägg av en heterologisk gen. Uppfinningen avser också en rekombinerad nukleinsyra, som innefattar en gE-gen eller del därav. Uppfinningen avser vidare glykoprotein gE, peptider baserade därpå och komplex av glykoproteiner gE och gI samt deras antikroppar. Uppfinningen avser ytterligare vaccinpreparat och diagnostiska redskap, som innefattar något av dessa material.

Menetelmä rokotekoostumuksen saamiseksi eläinten rokottamiseksi niiden suojaamiseksi BHV-1-virusta vastaan

5 Keksinnön ala

10 Keksintö koskee patageenien aiheuttamiin sairauksiin liittyvää rokottamista, ja siinä käytetään sekä klassisia menetelmiä elävän, heikennetyn rokotteen tai inaktivoitun rokotteen valmistamiseksi että uusia, DNA-rekombinaatio-
10 teknologiaan liittyviä menetelmiä.

Keksintö koskee erityisesti elävien heikennettyjen rokotteiden ja inaktivoitujen rokotteiden valmistamista eläinten, erityisesti nautaeläinten, suojaamiseksi naudan herpesvirus 1-tyyppiä (BHV-1) vastaan, jolloin nämä
15 rokotteet on suunniteltu sellaisiksi, että ne eivät ainoastaan ole turvallisia ja tehokkaita vaan myös tarjoavat mahdollisuuden erottaa rokotettujen eläinten joukosta tartunnan saaneet niistä, jotka eivät ole saaneet tartuntaa.

20 Keksinnön tausta

BHV-1, mukaan lukien naudan turvan limakalvojen ja henkitorven tulehdusta (*rhinotracheitis*) aiheuttava tarttuva virus (IBRV) ja merkivää emätintulehdusta (*pustular vulvovaginitis*) aiheuttava tarttuva virus (IPVV), on tärkeä tekijä nautaeläinten hengityselinten sairauksien ja
25 hedelmällisyshäiriöiden kehittymisessä. Akuutin infektion jälkeen BHV-1 jää usein kantajan elimistöön piilevässä muodossa. Piilevä virus voi aktivoitua uudelleen mm. rasituksen vaikutuksesta - mihin mahdollisesti liittyy tai ei liity kliinisiä oireita – ja lopulta poistua eritteenä. Tästä syystä tartunnan saaneita eläimiä on pidettävä mahdollisina elinikäisinä BHV-1:n levittäjinä. BHV-1:ä
30 esiintyy kotoperäisesti noin 75 %:ssa hollantilaisia karjatiloja. Erityisesti vanhemmat karjat ovat serologisesti positiivisia.

Saatavilla on useita inaktivoituja ("kuolleita") rokotteita ja useita heikennettyjä ("eläviä") rokotteita BHV-1 –infektiota vastaan. Inaktivoituja rokotteita
35 valmistetaan tappamalla BHV-1 –virus esimerkiksi lämpökäsittelyn, säteilytyksen tai etanoli- tai formaliinikäsittelyn avulla. Näin aikaansaatu suoja on kuitenkin usein riittämätön. Heikennettyjä rokotteita valmistetaan suurella

määrällä kulkuja homologisissa (naudan) tai heterologisissa, kuten sian tai koiran, soluissa, ja toisinaan viruksia käsitellään tällöin myös fysikaalisesti tai kemiallisesti. Tällä tavoin viruksen perimässä kehittyvät tuntemattomia mutaatioita/häviämiä, jotka usein vähentävät viruksen tautia-aiheuttavia ominaisuuksia. Heikennetyt elävät rokotteet antavat paremman suojan kuin inaktivoidut rokotteet, mm. sen vuoksi, että ne tuovat enemmän virusantigeenejä kantajan immuunijärjestelmään. Elävien rokotteiden toinen tärkeä etu on se, että ne voidaan antaa nenänsisäisesti eli siihen kohtaan, jossa villit virustyyppit ensiksi lisääntyvät tartunnan jälkeen. Kuitenkin elävissä rokotteissa on parantamisen varaa. Jotkin elävät rokotteet ovat ilmeisesti säilyttäneet sikiökuolemia aiheuttavan ominaisuutensa, mikä havaitaan erityisesti lihakseen ruiskutetuissa rokotteissa. Todennäköisesti myös kaikki elävät rokotteet pysyvät piilevinä rokotetussa lehmässä. Lisäksi on olemassa mahdollisuus, että jos rokote eroaa ainoastaan vähän villistä virustyyppistä, tapahtuu tautia aiheuttavien ominaisuuksien palautuminen.

Kuitenkin yksi vaikeimmista ongelmista on se, että BHV-1-rokotteet eivät voi estää villien virustyyppien aiheuttamaa tartuntaa. Tästä on seurauksena, että rokotettu karja voi myös levittää villiä BHV-1-virustyyppiä.

BHV-1-viruksen saamiseksi hallintaan on välttämätöntä saada aikaan tehokas ja turvallinen rokote, joka voidaan erottaa villistä virustyyppistä, koska käyttämällä tehokasta rokotetta voidaan vähentää BHV-1:n kiertoa huomattavasti, ja testi, jolla voidaan erottaa rokote ja villi virustyyppi, mahdollistaa tartunnan saaneiden eläinten löytämisen (ja sitten poistamisen) rokotetusta karjasta.

Aikaisemmin on kehitetty BHV-1-rokotteita, jotka vaikuttavat turvallisemmilta kuin perinteiset rokotteet ja jotka voidaan erottaa villistä virustyyppistä. On eristetty tymidiinikinaasi-häviämämutantti, joka aiheuttaa vähemmän sikiökuolemia, tulee harvemmin piileväksi eikä voi tulla uudelleen aktiiviseksi. Lisäksi DNA-rekombinaatiotekniikalla on rakennettu BHV-1-rokote, jossa on glykoproteiinin gIII geenin kohdalla häviämä, jolloin tämä rokote voidaan erottaa villistä BHV-1-virustyyppistä serologisin menetelmin. Näitä rokotteita vastaan on kuitenkin tiettyjä näkökohtia. Toisaalta tymidiinikinaasigeeni liittyy viruksen kahdentumiseen, ja pienemmät kahdentumisominaisuudet voivat johtaa heikompaan suojaan. Toisaalta

glykoproteiini gIII on tärkeä suojaavien vasta-aineiden tuottamisessa, mikä tekee gIII-häviämärokotteen teholtaan heikommaksi. Yksi käytännön ongelma on se, että rekombinoitujen rokotteiden nenänsisäinen anto, mikä antaa yleisesti parhaan suojan, on joissakin maissa kiellettyä. Näin ollen tarvitaan rokotetta, joka on sekä turvallinen että tehokas ja joka voidaan myös erottaa villistä BHV-1-virustyyppistä, jolloin on lisäksi toivottavaa, että ainakin yksi tällainen rokote on valmistettu viruksesta, joka on heikennetty perinteisellä menetelmällä, pikemmin kuin viruksesta, joka on valmistettu DNA-rekombinaatiotekniikalla.

Soluviljelmissä tapahtuneiden kulkujen kautta on saatu BHV-1-kanta, josta puuttuu glykoproteiinia gE vastaava geeni. Tutkimuksen ensimmäiset tulokset viittaavat siihen, että tämä geeni on hyvin hyödyllinen tehtäessä serologista erottelua BHV-1-viruksen villiin tyyppiin nähden ja että se liittyy taudinaiheuttamisominaisuuksien ilmentämiseen. Tästä syystä sen poisjättäminen lisää turvallisuutta ja saattaa tehdä tymidiinikinaasi-häviämien käytön tarpeettomaksi. Glykoproteiini gE vaikuttaa vähemmän tärkeältä suojan indusoimisessa kuin glykoproteiini gIII. Tavanomaisella menetelmällä heikennetty BHV-1-kanta, joka voidaan erottaa serologisesti viruksen villistä tyyppistä, on ainutlaatuinen. Tässä yhteydessä ensimmäistä kertaa kuvattu gE-geenin sijainti ja DNA-sekvenssi eivät ole olleet aiemmin tunnettuja, eivätkä myöskään tästä johdettavat oligonukleotidit, polypeptidit ja oligopeptidit. gE-geenin perusteella tehtävä serologinen erottelutesti on myös ainutlaatuinen.

Tämän "tavanomaisen" ("tavanomainen" tarkoittaa tässä heikennetyn viruksen tavanomaisen eristysmenetelmän käyttöä) gE-häviämämutantin tärkeä etu on se, että sitä on mahdollista antaa nenänsisäisesti niissä maissa, joissa tämä antotapa on rekombinoitujen rokotteiden osalta kielletty. Tämän tavanomaisen gE-häviämärokotteen lisäksi on kuitenkin valmistettu myös tarkoin määriteltäviä rekombinoituja rokotteita ottaen huomioon eri turvallisuusnäkökohdat. Myös näissä rekombinoiduissa rokotteissa on gE-häviämä - ja niissä voi mahdollisesti olla häviämä myös tymidiinikinaasi-geenin kohdalla - ja näitä voidaan myös käyttää heterologisten geenien ilmentymisen vektoreina. Kaikki nämä rekombinoidut rokotteet voidaan erottaa villistä virustyyppistä samalla gE-spesifisellä testillä. Yhden standarditestin käyttö useiden eri rokotteiden sarjan yhteydessä voi olla suuri

etu, kun BHV-1-virusta vastaan kamppaillaan kansainvälisesti. Tällaista menetelmää ei ole aikaisemmin kuvattu BHV-1-rokotteiden alalla.

5 Karjan BHV-1-vasteen serologinen analyysi osoitti, että tärkeä osa anti-gE-vasta-aineista suuntautuu glykoproteiini gE:n ja toisen BHV-1-glykoproteiinin, nimittäin glykoproteiini gI:n, muodostamaa kompleksia vastaan. Serologiset testit, jotka voivat (myös) osoittaa tällaisten kompleksispesifisten vasta-aineiden olemassaolon, voivat siis olla herkempiä kuin testit, jotka tunnistavat ainoastaan anti-gE-vasta-aineet. Karja, joka on
10 rokotettu yhdellä ainoalla gE-häviämämutantilla, voi tuottaa anti-gI-vasta-aineita, jotka voivat sekaantua anti-gI/gE-vasta-aineiden tunnistamiseen. Näin ollen keksinnön piiriin kuuluu myös gI/gE-kaksoishäviämärokote.

Keksinnön yhteenveto

15 Tämä keksintö tarjoaa ensisijaisesti menetelmän rokotekoostumuksen saamiseksi eläinten, erityisesti nisäkkäiden, tarkemmin nautaeläinten rokottamiseksi niiden suojaamiseksi BHV-1-virusta vastaan, jolloin rokotekoostumus muodostetaan BHV-1-mutantista ja sopivasta kantajasta tai apu-
20 aineesta, jolloin mainitussa BHV-1-mutantissa on häviämä glykoproteiinin gE geenissä, joka gE on proteiini, jolla erityisessä BHV-1-kannassa on kuvan 3A mukainen aminohapposekvenssi ja joka voidaan erottaa serologisesti villiä tyyppiä olevasta BHV-1:stä.

25 Keksinnön eräs edullinen suoritusmuoto käsittää menetelmän, jossa glykoproteiinin gE geenissä häviämä on aiheutettu heikentämismenetelmällä, kuten häviämämutantti Difivac-1, jota kuvataan jäljempänä.

30 Keksinnön muita edullisia suoritusmuotoja on menetelmä, jossa BHV-1:n häviämämutantissa häviämä glykoproteiinin gE geenissä on saatu aikaan DNA-rekombinaatiotekniikalla, kuten häviämämutantit 1B7 tai 1B8, joita kuvataan jäljempänä.

35 Keksinnön yksi edullinen suoritusmuoto käsittää menetelmän, jossa BHV-1:n kaksoishäviämämutantissa on häviämä sekä glykoproteiinin gE geenissä että glykoproteiinin gI geenissä, kuten gI/gE-kaksoishäviämämutantti Difivac-IE, jota kuvataan jäljempänä.

Keksinnön mukaisella menetelmällä voidaan valmistaa seuraavia rokotekoostumuksia:

- 5 Yksi mahdollisimman turvallinen suoritusmuoto on rokotekoostumus, joka käsittää BHV-1:n häviämämutantin, jossa on häviämä sekä glykoproteiinin gE geenissä että tymidiinikinaasigeenissä. Keksintö kattaa myös BHV-1:n häviämämutantin, jossa on häviämä glykoproteiinin gE geenissä, glykoproteiinin gI geenissä ja tymidiinikinaasigeenissä.

10

Rokotevalmiste eläinten, erityisesti nisäkkäiden, erityisesti nautaeläinten, rokottamiseksi niiden suojaamiseksi BHV-1 -virusta vastaan, joka valmiste käsittää edellä kuvatun BHV-1:n häviämämutantin, ja sopivan lisäkantajan tai apuaineen. Mainittu valmiste voi olla elävä tai inaktivoitu rokotevalmiste.

15

- Keksintö koskee myös menetelmää rokotekoostumuksen saamiseksi, jossa on BHV-1:n mutantti, jossa on häviämä glykoproteiinin gE geenissä ja joka sisältää heterologisen geenin, joka on siirretty DNA-rekombinaatiotekniikan avulla. Tämä on edullisimmin BHV-1:n mutantti, joka sisältää heterologisen geenin, joka on siirretty DNA-rekombinaatiotekniikalla glykoproteiinin gE geenin paikalle, joka heterologinen geeni on gE:n geenin säätelysekvenssien ohjauksessa ja on mahdollisesti liitetty gE:n geenin siihen osaan, joka koodaa signaalipeptidiä. Tämä heterologinen geeni voi myös olla BHV-1:n eri promoottorin ohjauksessa tai heterologisen promoottorin ohjauksessa. Kun
- 20 BHV-1 -mutantissa on glykoproteiinin gE geenin häviämän lisäksi muitakin häviämiä, kuten tymidiinikinaasigeenihäviämä ja/tai glykoproteiinin gI geenin häviämä, mainittu heterologinen geeni voidaan myös liittää tämän/näiden lisähäviämän/lisähäviämien kohtaan. Yhden vaihtoehdon muodostavat useat liitännäiset, joko yhdessä yhteen häviämäkohtaan tai sijoitettuina erikseen
- 25 useisiin häviämäkohtiin.
- 30

- Siirretty heterologinen geeni koodaa edullisesti toisen taudinaiheuttajan immunogeenistä proteiinia tai peptidiä, tai sytokiinia, joka edistää immuunivastetta. Sopivia sytokiineja ovat esimerkiksi interleukiini 2,
- 35 interferoni-alfa ja interferoni-gamma.

Keksintö tarjoaa myös menetelmän (elävän tai inaktivoituneen) rokotevalmisteen saamiseksi eläinten, erityisesti nisäkkäiden, erityisesti nautaeläinten, rokottamiseksi niiden suojaamiseksi (eri) taudinaiheuttajilta, joka valmistetaan käsittämällä BHV-1:n mutantin, jossa on heterologinen geeni, joka koodaa tämän toisen taudinaiheuttajan immunogeenistä proteiinia tai peptidiä, sekä sopivan kantajan tai apuaineen. Suoja voi luonnollisesti koskea useampia kuin yhtä taudinaiheuttajaa, t.s. se voi olla monenarvoinen rokote, jossa mutantti sisältää useita heterologisia geenejä.

- 10 Keksintö koskee lisäksi menetelmää sellaisen koostumuksen saamiseksi, joka käsittää rekombinanttinukleinihappoa, joka käsittää BHV-1:n glykoproteiinin gE geenin, osan tätä glykoproteiinin gE geeniä tai tästä glykoproteiinin gE geenistä johdetun nukleotidisekvenssin. Tämä koostumus voi sisältää kloonauksen- tai ilmentämisvektorin, jossa on rekombinanttinukleinihapon
- 15 liitännäinen, joka käsittää BHV-1:n glykoproteiinin gE geenin, osan tätä glykoproteiinin gE geeniä tai tästä glykoproteiinin gE geenistä johdetun nukleotidisekvenssin.

- Keksintö käsittää myös menetelmän sellaisen koostumuksen saamiseksi, joka
- 20 käsittää BHV-1:n glykoproteiinin gE, osan tätä glykoproteiini gE:tä, tästä glykoproteiini gE:stä johdetun peptidin tai glykoproteiinien gE ja gI kompleksin, sekä koostumuksen, joka käsittää vasta-ainetta, joka on spesifinen BHV-1:n glykoproteiineille gE, osalle tätä glykoproteiinia gE, tästä glykoproteiini gE:stä saadulle peptidille tai glykoproteiinien gE ja gI
- 25 kompleksille. "Vasta-aine" merkitsee tässä yhteydessä sekä polyklonaalista vasta-ainevalmistettä että monoklonaalista vasta-ainetta, joka on useimmissa sovelluksissa edullisempi. Termit "osa glykoproteiinia gE" ja "glykoproteiini gE:stä johdettu peptidi" merkitsevät tässä yhteydessä gE-spesifistä aminohapposekvenssiä, jonka pituus on yleensä ainakin noin 8 aminohappoa.

30

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

- Keksintö koskee sarjaa BHV-1-rokotteita, sekä eläviä että inaktivoituja, joille on yhteistä se, että niistä puuttuu glykoproteiinin gE geeni kokonaan tai
- 35 osaksi. Tämä sarja käsittää sekä luonnollisen gE-häviämämutantin että konstruoidut gE-häviämämutantit, joissa voi lisäksi olla tymidiinikinaasin geenin ja/tai glykoproteiinin gI geenin häviämä, sekä konstruoidut gE-

häviämämutantit, joita käytetään heterologisten geenien vektoreina. Keksintö koskee myös BHV-1:n glykoproteiinin gE geeniä koodaavia nukleotidisekvenssejä, näistä sekvensseistä johdettuja oligonukleotideja, itse glykoproteiini gE:tä, näistä johdettuja peptidejä sekä (monoklonaalisia tai polyklonaalisia) vasta-aineita, jotka kohdistuvat glykoproteiini gE:tä ja siitä johdettuja peptidejä vastaan. Keksintö koskee lisäksi BHV-1:n glykoproteiinien gE ja gI komplekseja sekä tällaisia komplekseja vastaan kohdistuvia vasta-aineita.

10 Näitä keksinnön mukaisia aineita voidaan käyttää seuraaviin tarkoituksiin:

- 1) karjan rokottamiseen BHV-1:n aiheuttamia tauteja vastaan siten, että voidaan erottaa toisistaan BHV-1-tartunnan saaneet eläimet ja rokotetut eläimet, jolloin tavanomaista ja konstruoitua rokotevalmistetta voidaan käyttää rinta rinnan;
- 15 2) karjan rokottamiseen sekä BHV-1:n aiheuttamia tauteja että muiden patogeenien aiheuttamia tauteja vastaan, joiden patogeenien suoja-antigeenien koodaussekvenssit voidaan sisällyttää BHV-1-häviämämutantteihin;
- 3) karjasta saadun veren, seerumin, maidon tai elimistön muun nesteen testaamiseen, jolloin voidaan serologisesti tai nukleiinihappomääritystekniikalla (esim. PCR) määrittää, ovatko eläimet saaneet BHV-1:n villin tyypin tartunnan tai onko ne rokotettu gE-häviämämutantilla.

25 BHV-1:n glykoproteiinin gE geenin ja glykoproteiinin gI geenin koodaus-
sekvenssistä johdettujen oligopeptidien, polypeptidien ja glykoproteiinien
synteesi

Esimerkeissä on kuvattu glykoproteiinin gE geenin (Fig. 3A) ja tämän geenin koodaavien eristettyjen DNA-jaksojen DNA-sekvenssianalyysin tulokset, joiden avulla on standardinmukaisia molekyylibiologisia menetelmiä käyttäen mahdollista sekä valmistaa synteettisesti gE-proteiinin peptidejä (oligo- tai polypeptidejä) että ilmentää gE-proteiinia kokonaisuudessaan tai suurelta osin prokaryootista reittiä pitkin (bakteereissa) tai eukaryootista reittiä pitkin (esimerkiksi hiirien tai rottien soluissa). Näitä reittejä käyttäen voidaan saada gE-spesifinen antigeeni, jota voidaan käyttää esimerkiksi gE-spesifisten monoklonaalisten vasta-aineiden (Mab:t) tuottamiseen. Lisäksi gE-spesifistä antigeeniä (ja gE-spesifisiä monoklonaalisia vasta-aineita) voidaan käyttää

serologisissa testeissä, joilla voidaan erottaa toisistaan BHV-1:n gE-häviämärokotteella rokotetut eläimet ja BHV-1:n villin virustyyppin tartunnan saaneet eläimet.

5 Esimerkeissä kuvatus glykoproteiinin gI geenin osittaisen DNA-sekvenssianalyysin tulosten avulla ja tämän geenin koodaavien eristettyjen DNA-jaksojen avulla yhdessä glykoproteiini gE:tä ilmentävien eukaryoottisten solujan kanssa on mahdollista ilmentää gI/gE-kompleksia eukaryoottisissa soluissa (ks. Fig. 13 ja 14). Tätä glykoproteiinikompleksia voidaan käyttää
10 gI/gE-spesifisten monoklonaalisten vasta-aineiden tuottamiseen. gI/gE-kompleksia voidaan myös käyttää antigeenina serologisissa testeissä, joilla voidaan erottaa toisistaan BHV-1:n yksinkertaisella gE-häviämämutantilla tai kaksinkertaisella gI/gE-häviämämutantilla rokotetut eläimet ja BHV-1:n villin virustyyppin tartunnan saaneet eläimet.

15

gE-spesifiset peptidit

Tunnetun proteiinikoodaussekvenssin perusteella voidaan automaattisen syntetisoijan avulla valmistaa polypeptidejä, joissa on vähintään n. 40-50
20 aminohappoa. Kun BHV-1:n Lam-kannan glykoproteiinin gE proteiini-koodaussekvenssi on nyt purettu (Fig. 3A), voidaan synteettisesti valmistaa tämän BHV-1:n glykoproteiinin gE polypeptidejä. Tällaisilla polypeptideillä voidaan standardinmukaisilla menetelmillä immunisoida koe-eläimiä, kuten hiiriä tai kaneja, gE-spesifisten vasta-aineiden tuottamiseksi. Lisäksi tällaisia
25 gE-spesifisiä peptidejä käyttäen voidaan edelleen määrittää ne kohdat (epitoopit), joissa anti-gE-vasta-aineet reagoivat gE-proteiinin kanssa, esimerkiksi PEPSCAN-menetelmän avulla (Geysen ym., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3998-4002). gE-spesifisiä oligopeptidejä voidaan myös käyttää serologisissa testeissä anti-gE-vasta-aineiden osoittamiseksi.

30

Prokaryoottinen gE:n ilmentäminen

gE-proteiinin valmistamiseksi synteettisesti bakteereissa (eli gE:n prokaryoottiseksi ilmentämiseksi) on ne DNA-jaksot, jotka koodaavat glyko-
35 proteiini gE:tä tai sen osia, kloonattava prokaryoottiin ilmentämisvektoreihin. Prokaryoottiset ilmentämisvektorit ovat pyöreitä DNA-molekyylejä, jotka voivat pysyä bakteerissa erillisinä kahdentuvina

molekyyleinä (plasmideina). Nämä ilmentämisvektorit sisältävät yhden tai useampia merkitsingenejä, jotka koodaavat antibioottien vastustuskykyä ja mahdollistavat näin ilmentämisvektorin sisältävien bakteerien valinnan. Lisäksi ilmentämisvektorit käsittävät (usein ohjailtavan) promoottorialueen, jonka taakse voidaan sitoa DNA-jaksot, joita sitten ilmennetään promoottorin vaikutuksesta. Useissa nykyisissä prokaryoottisissa ilmentämisvektoreissa haluttu proteiini ilmennetään fuusioituna ns. kantajaproteiiniin. Tätä tarkoitusta varten vektorissa sijaitsee promoottorin takana kantajaproteiinin koodaussekvenssi, ja haluttu DNA-jakso voidaan liittää suoraan tämän viereen. Fuusioproteiinit ovat usein pysyvämpiä ja helpommin tunnistettavia ja/tai eristettäviä. Pysyvyysaste, jonka tietty fuusioproteiini voi saavuttaa tietyssä bakteerikannassa, vaihtelee fuusiosta ja kannasta toiseen. Yleensä kokeillaan eri yhdistelmiä.

15 Glykoproteiinin gE geenin eukaryoottinen ilmentäminen

Vaikka proteiinien prokaryoottinen ilmentäminen usein tarjoaa joitakin etuja, proteiineista puuttuvat ne vaihtelumahdollisuudet, kuten glykosylaatio ja vastaavat, jotka esiintyvät eukaryoottisissa soluissa. Tästä syystä eukaryoottisesti ilmennetty proteiini on usein sopivampi antigeeni. Proteiineja ilmennetään heterologisesti eukaryoottisissa soluissa, esimerkiksi rotan tai hiiren soluissa, käyttämällä eukaryoottisia ilmentämisvektoreita. Nämä vektorit ovat plasmideja, joita ei voida ainoastaan lisätä *E. coli* -soluissa vaan jotka myös elävät pysyvästi eukaryoottisissa soluissa. Prokaryoottisen valintamerkitsimen lisäksi ne sisältävät myös eukaryoottisen valintamerkitsimen. Analogisesti prokaryoottisten ilmentämisvektorien kanssa eukaryoottiset ilmentämisvektorit käsittävät promoottorialueen, jonka taakse halutut geenit voidaan liittää. Eukaryoottisissa vektoreissa olevat promoottorisekvenssit ovat kuitenkin spesifisiä eukaryoottisille soluille. Lisäksi eukaryoottisissa vektoreissa fuusioitumista kantajaproteiineihin käytetään vain harvoin hyväksi. Nämä vektorit siirretään eukaryoottisiin soluihin standardinmukaisella siirtomenetelmällä (F.L. Graham ja A.J. Van der Eb, 1973, *Virology* 52, 456-467). Eukaryoottisten plasmidivektorien lisäksi on myös virusvektoreita, joissa heterologinen geeni siirretään viruksen perimään (esim. retrovirukset, herpesvirukset ja lehmärokkovirus). Eukaryoottiset solut voidaan sitten tartuttaa rekombinanttiviruksilla.

Yleisesti ei voida ennustaa, mitkä vektorit ja solutyypit sopivat parhaiten tietylle geenituotteelle. Useimmiten kokeillaan monia yhdistelmiä.

Sekä glykoproteiini gE:n että glykoproteiini gI:n eukaryoottinen ilmentäminen

5

Proteiinin saama lopullinen rakenne riippuu sen primääristä aminohapposekvenssistä, laskostuneisuudesta, käännöksen jälkeisistä muunnelmista ym. Yksi tärkeä proteiinin rakenteeseen vaikuttava tekijä on sen vuorovaikutus yhden tai useamman toisen proteiinin kanssa. Tutkimuksessa on havaittu, että myös BHV-1:n glykoproteiini gE muodostaa kompleksin ainakin yhden toisen glykoproteiinin, nimittäin BHV-1:n glykoproteiinin gI kanssa. Ensimmäinen havainto tällaisesta kompleksista saatiin tuloksistamme mahdollisilla monoklonaalisilla anti-gE-vasta-aineilla Mab:t 1, 51, 67, 75 ja 78 (ks. taulukko 2). Nämä monoklonaaliset vasta-aineet eivät reagoineet Difivac-1:n tai Lam gE:n kanssa, mutta ne eivät myöskään tunnistaneet glykoproteiini gE:tä ilmentäviä 3T3-soluja. Kuitenkin nämä monoklonaaliset vasta-aineet reagoivat gE:tä ilmentävien 3T3-solujen kanssa Difivac-1-infektion jälkeen, mikä osoittaa, että tarvitaan täydentäviä tekijöitä, jotta glykoproteiini gE saisi näiden monoklonaalisten vasta-aineiden täydellisen antigeenisen vastaavuuden. Joissakin Mab 81:llä tekemissämme radioimmunologisissa saostuskokeissa havaitsimme yhteissaostumista proteiinin kanssa, jonka ilmeinen molekyylipaino oli 63 kD.

Ottaen huomioon, että herpes simplex -viruksen glykoproteiini gE muodostaa kompleksin vastaavan molekyylipainon omaavan proteiinin kanssa (HSV1:n glykoproteiini gI), päätelimme, että BHV-1:n glykoproteiini gE muodostaa kompleksin glykoproteiini gI:n BHV-1-homologin kanssa. Tämän BHV-1:n gE/gI-kompleksin tutkimiseksi ja sopivan antigeenirakenteen omaavan gE-antigeenin tuottamiseksi ilmensimme kumpaakin glykoproteiinia yhdessä eukaryoottisessa solussa. Tätä varten käytimme samoja menetelmiä, joita on kuvattu edellä pelkästään glykoproteiini gE:n eukaryoottisen ilmentämisen yhteydessä. Ainoa lisäedellytys on se, että käytetään ilmentämisvektoreita, joilla on erilaiset eukaryoottiset valintamerkitsimet.

Serologiset testit

5 Serologiset menetelmät Difivac-1:llä rokotetun karjan ja BHV-1:n villin virustyyppin tartunnan saaneen karjan erottamiseksi toisistaan gE:n vastaisten vasta-aineiden perusteella perustuvat sopivimmin monoklonaalisten gE:tä vastaan kohdistuvien vasta-aineiden käyttöön.

Näitä voidaan käyttää seuraavasti:

- 10 a) Van Oirschotin ym. kuvaaman periaatteen mukaan (Journal of Virological Methods 22, 191-206, 1988). Tässä Aujeszky'n taudin aiheuttavan viruksen vastaisten gI-vasta-aineiden ELISA-määrittämisessä vasta-aineet tunnistetaan sen estovaikutuksen perusteella, joka niillä on kahden kaksi eri epitooppia gI:ssä omaavan monoklonaalisen vasta-
- 15 aineen reaktioon. Testi tehdään seuraavasti: Mikrotiitterilevyjä päällystetään Mab 1:llä, ne pidetään yli yön 37°C:ssa, minkä jälkeen ne varastoidaan, esim. 4°C:ssa tai -20°C:ssa. Tutkittavaa seerumia esi-
- 20 inkuboidaan antigeenin kanssa erillisissä päällystämättömissä mikrotiitterilevyissä, esim. 2 h ajan 37°C:ssa. Mab 1:llä päällystetyt levyt pestään, esim. 5 kertaa, minkä jälkeen piparjuuriperoksidaasiin (HRPO) yhdistettyä Mab 2:ta lisätään näihin levyihin. Tämän jälkeen esi-
- 25 inkuboidut seerumivasta-aineseokoitukset siirretään levyihin, joissa on molemmat Mab:t, minkä jälkeen inkuboidaan esim. 1h ajan 37°C:ssa. Levyt pestään, ja kuhunkin kuoppaan lisätään substraattia. Levyjä pidetään noin 2 h ajan huoneenlämmössä, kunnes ne luetaan spektrofotometrisesti. Kussakin levyssä on neljä negatiivista kontrolliseerumia ja neljä positiivisen seerumin sarjalaimennosta. Positiiviseksi katsotaan seerumi, jonka optinen tiheys (OD-arvo) on vähemmän kuin 50 % samalla levyllä tutkitun neljän negatiivisen kontrolliseerumin keskimääräisestä OD-arvosta.
- 30 b) Epäsuoran kaksoisvasta-aine-sandwich (Indirect Double Antibody Sandwich, IDAS) periaatteen mukaan. Tällöin mikrotiitterilevyt päällystetään gE-proteiinia vastaan suunnatulla monoklonaalisella vasta-
- 35 aineella tai polyklonaalisella seerumilla. gE-antigeenivalmisteella inkubointi saa aikaa gE:n sitoutumisen päällysteeseen. Tutkittavassa naudan seerumissa erityisesti gE:tä vastaan suunnatut vasta-aineet sitoutuvat tämän jälkeen gE:hen. Anti-naudan immunoglobuliinin konjugaatit tunnistavat nämä sitoutuneet vasta-aineet. Tämän

- konjugaatin vasta-aineet sitoutuvat kovalenttisesti peroksi-
daasientsyymiin. Lopuksi sitoutunut konjugaatti saadaan näkyviin
lisäämällä kromogeenistä substraattia. Tämän reaktion spesifisyys
tarkistetaan tekemällä samat toimenpiteet gE-negatiivisella
5 kontrollivalmisteella gE-antigeenivalmisteen asemesta. Kussakin mikro-
tiitterilevyssä on sekä positiivista että negatiivista kontrolliseerumia.
Testi on pätevä, jos positiivisella seerumilla saadaan positiivinen tulos
tietyllä laimennoksella. Seerumi on positiivinen, jos sen optinen tiheys
on 0,2 yksikköä korkeampi kuin standardinmukaisen negatiivisen
10 kontrolliseerumin optinen tiheys.
- c) Kohdassa 2) kuvatun IDAS-periaatteen mukaisesti, mutta käyttämällä
tutkittavan seerumin inkuboinnin jälkeen anti-gE-monoklonaalista vasta-
ainetta ja piparjuuriperoksidaasia anti-naudan immunoglobuliinin
konjugaatin asemesta. Anti-gE-monoklonaalisen vasta-aineen asemesta
15 voidaan käyttää anti-gE-peptidiseerumia tai anti-gE polyklonaalista
seerumia. Levyt pestään, ja kuhunkin kuoppaan lisätään kromogeenistä
substraattia. Levyjä pidetään esim. 2 h ajan huoneenlämmössä, kunnes ne
luetaan spektrofotometrisesti. Kussakin levyssä on neljä negatiivista
kontrolliseerumia ja neljä positiivisen seerumin sarjalaimennosta.
20 Positiiviseksi katsotaan seerumi, jonka optinen tiheys (OD-arvo) on
vähemmän kuin 50 % samalla levyllä tutkitun neljän negatiivisen
kontrolliseerumin keskimääräisestä OD-arvosta.
- d) ELISA-estoperiaatteen mukaan, jolloin mikrotiitterilevy päällystetään
yön aikana virusantigeenillä, joka voi olla puhdistettu tai puhdistamaton.
25 Näillä levyillä tutkittavaa seerumia inkuboidaan esimerkiksi yhden
tunnin ajan tai kauemmin 37°C:ssa. Pesun jälkeen levyille lisätään anti-
gE monoklonaalista vasta-ainetta, minkä jälkeen inkuboidaan
esimerkiksi 1 h ajan 37°C:ssa. Anti gE monoklonaalisen vasta-aineen
asemesta voidaan käyttää anti-gE peptidiseerumia tai anti-gE
30 polyklonaalista seerumia. Levyt pestään, ja kuhunkin kuoppaan lisätään
kromogeenistä substraattia. Levyjä pidetään esim. 2 h ajan
huoneenlämmössä, kunnes ne luetaan spektrofotometrisesti. Kussakin
levyssä on neljä negatiivista kontrolliseerumia ja neljä positiivisen
seerumin sarjalaimennosta. Positiiviseksi katsotaan seerumi, jonka
35 optinen tiheys (OD-arvo) on vähemmän kuin 50 % samalla levyllä
tutkitun neljän negatiivisen kontrolliseerumin keskimääräisestä OD-
arvosta.

Kaikissa em. järjestelyissä voidaan käyttää tavanomaisesti kasvatettua gE:n sisältävää virusantigeeniä, mutta myös prokaryoottien tai eukaryoottien kautta ilmenettyä gE-antigeeniä. Vaihtoehtoisesti voitaisiin em. diagnostisissa
5 testeissä käyttää tavanomaisen antigeenin asemesta BHV-1:n gE-sekvenssiin perustuvia oligopeptidejä. Lisäksi tällaisia oligopeptidejä voitaisiin käyttää ns. "lehmänpuoleisten" testien kehittämisessä periaatteen mukaisesti, joka on kuvattu Kempin ym. artikkelissa, Science 241, 1352-1354, 1988. Tällainen testi perustuisi siis siihen, että tartunnan saaneissa eläimissä olevaa gE:tä
10 vastaan toimivat vasta-aineet sitovat oligopeptidin antigeenisekvenssin. Tällaista testiä varten oligopeptidi täytyisi kytkeä monoklonaaliseen vasta-aineeseen, joka suuntautuu naudan punasoluja vastaan.

Nukleiinihappoanalyysi polymeerasiketjureaktiota käyttäen

15 Polymeerasiketjureaktiossa voidaan käyttää esimerkiksi oligonukleotideja (koettimia ja alukkeita) rokotettujen ja tartunnan saaneiden eläinten erottamiseksi toisistaan. Polymeerasiketjureaktio (PCR) on menetelmä, jolla taudinaiheuttajan nukleiinihapot voidaan moninkertaistaa miljardeja kertoja
20 lyhyessä ajassa (De polymerase kettingreactie, P.H. Hilderink, J.A. Wagenaar, J.W.B van der Giessen ja B.A.M. van der Zeijst, 1990, Tijdschrift voor Diergeneeskunde deel 115, 1111-1117). gE-oligonukleotidit voidaan valita siten, että gE-positiivisessa perimässä muodostuu eri tuote kuin gE-negatiivisessa perimässä. Tässä on se etu, että myös gE-häviämärokotteella
25 rokotettu eläin antaa PCR-testissä positiivisen signaalin. Tämä menetelmä riippuu kuitenkin testattavasta eläimestä saadussa näytteessä, esimerkiksi veressä, olevien virusnukleiinihappojen esiintymisestä.

30 Akuutin BHV-1-infektion jälkeen on suuri mahdollisuus, että veressä voidaan osoittaa olevan BHV-1-spesifisiä nukleiinihappoja, mutta vielä ei ole osoitettu, voiko BHV-1-nukleiinihappoja esiintyä veressä myös piilevän vaiheen aikana.

BHV-1:n käyttö vektorina

35 Heterologisten geenien ilmentämiseksi BHV-1:n genomissa on välttämätöntä, että käytettävissä on täsmällistä tietoa alueesta, johon heterologinen geeni liitetään. Olennaisissa sekvensseissä ei saisi esiintyä mitään häiriöitä, ja

käytettävissä on oltava sääteleviä sekvenssejä heterologisen geenin ilmentämiseksi. Glykoproteiinin gE geeni on periaatteessa sopiva kohta heterologisten geenien ilmentämiseksi. gE-geeni ei ole oleellinen, eikä gE-geenin korvaamiselle heterologisella geenillä siis ole mitään estettä. Näin ollen heterologinen geeni voidaan sijoittaa siten, että se tulee gE-geenin säätelevien sekvenssien vaikutuspiiriin. Ei kuitenkaan ole välttämätöntä käyttää gE-geenin sääteleviä sekvenssejä. Heterologisten geenien ilmentämistä voidaan vaihtoehtoisesti kontrolloida eri geenien muilla, esim. vahvemmillä säätelevillä sekvensseillä. On myös mahdollista sitoa heterologinen geeni gE-geenin (vienti) signaalipeptidiin, jolloin voidaan vaikuttaa heterologisen geenin tuotteen erittymiseen. On selvää, että gE-geenin ja gE-proteiinin tarkka tuntemus mahdollistaa BHV-1:n käyttämisen vektorina erittäin säädellysti. Kehitetyt vektorit voidaan lisäksi erottaa serologisesti villistä tyypistä. Heterologisia geenejä ilmentäviä BHV-1-mutantteja voidaan muodostaa samaan tapaan kuin gE-häviämämutantteja, joita esitetään esimerkeissä. Häviämäjaksot on tällöin kuitenkin korvattava häviämäkohdassa jaksolla, jossa on heterologinen geeni.

Esimerkkejä

- 20 1. Luonnollisen gE-häviämämutantin eristäminen ja tunnistaminen
 - a) Luonnollisen mutantin eristäminen
- 25 Perimän DNA:ta eristettiin useista tavanomaisesti heikennetyistä rokotteista standardinmukaisilla menetelmillä ja analysoitiin käyttäen restriktioentsyymejä. Erityisesti etsittiin perimän poikkeamia, jotka voisivat soveltua erotukseen BHV-1:n villistä virustyyppistä.
- 30 Huomiota kiinnitettiin erityisesti BHV-1:n perimän U_S-alueeseen, koska tällä alueella – analogisesti herpes simplex -viruksen kanssa – on todennäköisesti epäolennaisia glykoproteiineja koodaavia geenejä [Identification of a herpes simplex virus 1 glykoprotein gene within a gene cluster dispensable for growth in cell culture, R. Longnecker, S. Chatterjee, R.J. Whitley ja B. Roizman (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 4303-4307].
- 35

BHV-1-rokoteannoksesta, joka on saatu Zagrebin yliopistosta Jugoslaviasta (Lugovic ym, Veterinarski Archiv 55, 241-245, 1985), useilla kuluilla naudan sikiön munasoluissa ja naudan sikiön henkitorven soluissa (Ebtr), on löydetty poikkeava U_S-alue normaalin U_S-alueen lisäksi. Tämä
5 rokote muodosti myös sekä suuria että pieniä plakkeja Ebtr-soluissa. Tästä sekapopulaatiosta eristettiin poikkeavan U_S-alueen omaava virus käyttämällä kolmea rajoittavaa laimennusvaihetta, jolloin kullakin kertaa valittiin pienet plakit. Tällä menetelmällä eristettyä virusta tutkittiin edelleen, ja sille annettiin nimitys Difivac-1. Se tallennettiin 27.5.1992 Institut Pasteuriin, Pariisi,
10 Ranska, tallennusnumerolla I-1213.

b) gE-geenin häviämisen tunnistaminen Difivac-1:ssä

Tätä U_S-alueella olevaa poikkeamaa tutkittiin edelleen eristämällä Difivac-1:n
15 perimän DNA:ta standardinmukaisilla menetelmillä ja käyttämällä Southern blot -analyysiä (Fig. 1A). Tämän blotin hybridisointi ³²P-leimatulla villin tyypin HindIII K-jaksolla vahvisti, että tämä keskellä U_S-aluetta sijaitseva osa on Difivac-1:ssä noin 1,0 kb lyhyempi. Lisäksi tällä analyysillä voitiin arvioida puuttuvan osan sijaintikohta (Fig. 1B). Tätä häviämää analysoitiin
20 edelleen eristämällä BHV-1:n villin tyypin Lam-kannan U_S-alue ja kloonamalla se prokaryoottisiin vektoreihin. Tätä tarkoitusta varten Lam-kannan perimässä olevaa DNA:ta (Fig. 2A) eristettiin ja kloonattiin standardinmukaisilla menetelmillä vektoreihin pUC18, pACYC ja pBR322 (Fig. 2B). Häviämisen oletetun sijaintikohdan ympäristöstä koottiin fyysinen
25 kartta (Fig. 2C). Tämän fyysisen kartan perusteella muodostettiin tämän alueen nukleotidisekvenssien määrittämiseen soveltuvia alaklooneja vektoreihin pKUN19 ja pUC18 (Fig. 2D). Näitä alaklooneja käyttäen määritettiin Sangerin menetelmän avulla koko alueen (ks. Fig. 2C) molempien säikeiden nukleotidisekvenssi. Tämä nukleotidisekvenssi (SEQ ID NO:1) analysoitiin
30 PC/Gene-ohjelman avulla. Transkriptiosta kävi ilmi, että nukleotidit (nt) 168-1893 koodaavat 574 aminohapon avointa lukukehystä (Fig. 3A). Jatkoanalyysi osoitti, että tällä aminohapposekvenssillä on membraanin läpäisevän glykoproteiinin ominaisuudet, kuten kuvassa 3B on osoitettu. Ensimmäiset 26 aminohappoa (aa) voidaan tunnistaa tyypilliseksi eukaryoottiseksi
35 vientisignaalksi, ja aminohappojen 423 ja 450 välinen alue voidaan tunnistaa membraanin läpäiseväksi alueeksi. Lisäksi tässä sekvenssissä esiintyy kolme potentiaalista N-sidoksista glykosylaatiokohtaa. Tässä ennusteen mukaisessa

aminohapposekvenssissä on selviä yhtäläisyyksiä *herpes simplex* -viruksen (HSV) glykoproteiini gE geenin kanssa; ks. Fig. 4A ja 4B. Nämä ja muut yhtäläisyydet ovat perustana päätelmälle, että löydetty geeni on BHV-1:n gE-homologi. Tästä syystä geeniä kutsutaan gE:ksi. p318-jakso eristettiin, jotta
 5 voitiin määrittää, missä määrin tämä BHV-1:n gE-geeni puuttuu Difivac-1:stä. p318-jakso alkaa AluI-kohdasta 55 nukleotidia ennen oletettua BHV-1:n gE:n avointa lukukehystä ja päättyy 133 nukleotidia sen jälkeen. Difivac-1:n perimän DNA:ta analysoitiin tällä p318-jaksolla käyttäen Southern blot-hybridisointia. Tässä tuli esille, että Difivac-1 ei sisällä p318:n tunnistamia
 10 sekvenssejä (Fig. 5). Tämä koe vahvisti sen, että Difivac-1 sisältää häviämän, ja osoittaa selvästi, että tämä häviämä ulottuu koko gE-geenin alueelle.

Häviämäalueen koon ja sijaintikohdan määrittämiseksi Difivac-1:n U_S-alueen kattavia perimän sekvenssejä kloonattiin prokaryoottisiin vektoreihin (ks. Fig.
 15 11C). 14,5 kb:n pituinen EcoRI-jakso kloonattiin pACYC-vektoriin, jolle annettiin nimitys p775. 7,4 kb:n pituinen HindIII-jakso kloonattiin erikseen pUC18-vektoriin, jolle annettiin nimitys p728. Kloonista p728 eristettiin kaksi alakloonaa: 1,4 kb:n pituinen PstI-jakso kloonissa p737 ja 350 kb:n pituinen AluI-PstI-jakso kloonissa p754. Näiden kloonien restriktioentsyymianalyysi ja
 20 Southern blot -analyysi (tietoja ei esitetty) osoitti, että Difivac-1:n gE-häviämän pituus on 2,7 kb, ja se alkaa 5'-päästä gE-geenistä ja päättyy U_S-alueen rajalle. Nämä 2,7 kb on korvattu 1 kb:n segmentin kahdentumalla, joka on sijoitettu gE-geeniä vastapäätä olevalle U_S-alueelle (ks. Fig. 11B). Näiden
 25 analyysien tulosten vahvistamiseksi ja täsmällisen rekombinaation määrittämiseksi määritettiin kloonin p754 liitännäisen suurimman osan nukleotidisekvenssi ja sitä verrattiin villin tyypin sekvensseihin (ks. Fig. 12). Tämä analyysi osoitti, että rekombinaatiokohta sijaitsee 77 bp ennen gE-geenin aloituskloonaa.

30 c) Difivac-1:n turvallisuuden ja tehokkuuden arviointi

Difivac-1:tä testattiin 7 viikon ikäisissä BHV-1-seronegatiivisissä vasikoissa, joilla ei esiintynyt mitään taudinaiheuttajia. Kahdeksan vasikkaa rokotettiin
 35 nenänsisäisesti 2 ml:lla 10⁵ TCID₅₀:a, josta 1 ml ruiskutettiin kumpaankin sieraimeseen. Kahdeksan 7 viikon ikäistä BHV-seronegatiivista vasikkaa, joilla ei esiintynyt taudinaiheuttajia ja jotka pidettiin erillisessä eristysyksikössä, saivat nenänsisäisesti 2 ml elatusainetta ja toimivat rokottamattomina

verrokkeina. Viiden viikon kuluttua rokotuksesta rokotetuille ja verrokkeina toimiville vasikoille annettiin sieraimen sisäisesti BHV-1:n hyvin voimakasta Iowa-kantaa 10^7 TCID₅₀. Kuusi viikkoa tämän altistamisen jälkeen kaikille vasikoille annettiin lihaksen sisäisesti deksametasonia 5 päivän ajan otaksutun piilevän viruksen uudelleenaktivoimiseksi. Samalla tarkkailtiin klinisiä oireita, peräsuolen lämpötilaa ja ruhon kasvua. Virus eristettiin sierainvanutupoista, ja seerumista määritettiin neutraloivien vasta-aineiden tiitterit.

- 5
- 10 Rokotuksen jälkeen vasikoiden käyttäytyminen, ruokahalu, peräsuolen lämpötila ja kasvu pysyi normaalina, mutta rokotetuilla vasikoilla esiintyi jonkin verran seerumin erittymistä nenästä ja jonkin verran syljen liikaeritystä. Nenän limakalvojen haavaumia ei havaittu. Difivac-1:ä erittyi rokotuksen jälkeen sierainvanutuppoihin (Fig. 17). Kaikissa rokotetuissa vasikoissa
- 15 kehittyi neutraloivia BHV-1-vasta-aineita.

Altistamisen jälkeen kaikissa rokottamattomissa verrokkivasikoissa ilmeni haluttomuutta, ruokahaluttomuutta, silmän ja nenän eritteiden vuotamista, alaleuan ikenien punoitusta, vakavia nenän limakalvojen haavaumia 14 päivän kuluessa altistamisesta ja kasvun pysähtyminen 4 päivän kuluessa. Rokotetuissa vasikoissa oli pieniä, nopeasti paranevia nenän limakalvojen haavaumia eikä lainkaan kasvun pysähtymistä. Päivittäiset kliiniset arvot, peräsuolen lämpötila ja kasvun kehittyminen altistamisen jälkeen on esitetty kuvissa 18, 19 ja 20. Altistamisen jälkeen kaikki vasikat erittivät virusta nenästä, mutta viruksen erittymisen määrä ja kesto oli huomattavasti pienempi rokotetuilla vasikoilla (Fig. 21). Rokotetuissa vasikoissa kehittyi sekundäärinen vasta-ainevaste, ja kaikissa rokottamattomissa vasikoissa syntyi vasta-aineita altistamisen jälkeen.

- 20
- 25
- 30 Uudelleenaktiivoinnin jälkeen altistava virus eristettiin yhdestä rokotetusta ja viidestä rokottamattomasta vasikasta. Difivac-1:tä ei voitu aktivoida uudelleen.

- 35 Edellä esitetyt tulokset osoittavat, että Difivac-1 ei aiheuttanut juuri mitään taudin oireita nuorilla vasikoilla eikä sitä voitu uudelleenaktivoida. Difivac-1 vähensi huomattavasti taudin vakavuutta ja viruksen erittymisen määrää altistamisen jälkeen.

Lopuksi voidaan todeta, että Difivac-1 on turvallinen ja tehokas rokote annettavaksi karjalle BHV-1-infektioita vastaan.

5 2. BHV-1:n rekombinoitujen gE-häviämämutanttien valmistaminen

Toisistaan erotettavien BHV-1-rokotteiden aikaansaamiseksi, jotka ovat molekyylirakenteeltaan paremmin määriteltyjä kuin Difivac-1 ja sisältävät haluttaessa gE-geenin häviämän lisäksi esimerkiksi tymidiinikinaasigeenin häviämän, konstruointiin rekombinoituja gE-häviämämutantteja Difivac-1:n lisäksi. gE-häviämäjakso voitiin konstruoida lähtemällä glykoproteiinin gE-geenin määritetystä sijaintikohdasta ja käyttämällä kloonattuja gE-geeniä rajaavia DNA-jaksoja. Käyttäen standardinmukaista menetelmää (F.L. Graham ja A.J. Van der Eb, 1973, Virology 52, 456-467) tämä häviämäjakso voitiin rekombinoida BHV-1-kannan villin tyypin perimään, jolloin tuloksena saatiin gE-häviämämutantti.

a) gE-häviämäjakson konstruoiminen

20 gE-häviämäjakson konstruoimiseksi pyrittiin saamaan osa, josta toisaalta puuttuu koko gE-sekvenssi ja joka toisaalta sisältää riittävän rajasekvenssin, joka mahdollistaa villin tyypin perimän kanssa tapahtuvan rekombinoitumisen. 5'-puolella (alkupäässä) valittiin 1,2 kb:n pituinen PstI-AsuII-jakso, joka päättyy 18 nukleotidia ennen gE-geenin aloituskoodonia. 3'-pään (loppupään) 25 jaksoa varten valittiin 1,2 kb:n pituinen EcoNI-DraI-jakso, joka alkaa 2 nukleotidia ennen gE-geenin lopetuskoodonia (Fig. 6).

gE-häviämäjakson konstruoimiseksi BHV-1:n Lam-kannan 8,4-kb:n pituisesta, gE-geenin 5'-puolella sijaitsevasta HindIII K-jaksosta saatu 1,4 30 kb:n pituinen PstI-SmaI-jakso alakloonattiin pUC18-plasmidin SmaI- ja PstI-kohtiin. Tälle kloonille annettiin nimitys p515. gE:n 3'-puolella sijaitseva 4,1 kb:n pituisesta HindIII-EcoRI-kloonista saatu EcoNI-SmaI-jakso kloonattiin p515:n ainoaan AsuII-kohtaan. Näin ollen gE-häviämäjakson konstruktio saatiin valmiiksi, ja näin konstruoidulle kloonilla annettiin nimitys p519. 35 Vaikka periaatteessa p519:n koko PstI-SmaI-liitännäistä on mahdollista käyttää gE-häviämäjaksona, tämä ei ole suositeltavaa. Itse asiassa PstI-SmaI jatkuu noin 100-150 emäsparin (bp) verran U₅-aluetta rajaavaan

toisintosekvenssiin. Tämä 100-150 bp:n kappale voisi rekombinoitua U_S-alueen toisen puolen toisintosekvenssin kanssa, jossa ei ole gE-geeniä, ja voisi tällöin tuottaa vääränlaisia rekombinaatiotuotteita. Tästä syystä rekombinaatiokokeiluun valittiin PstI-DraI-jakso, niin että 100bp toisinnosta poistuu.

b) gE-häviämäjakson rekombinaatio BHV-1:n villin tyypin perimän kanssa

Konstruoidun gE-häviämäjakson ja BHV-1:n villin tyypin perimän rekombinaation aikaansaamiseksi mikrogrammamääriä molempia DNA-molekyyliä siirretään yhdessä naudan sikiön henkitorven (Ebtr) soluihin F.L. Grahamin ja A.J. Van der Ebin standardinmukaisen menetelmän mukaan (1973, Virology 52, 456-467). Solujen rekombinaatiomekanismien vaikutuksesta rekombinoituu pieni määrä (2-4 %) soluihin liittyneitä DNA-molekyyliä. Rekombinoitujen häviämämutanttien valitsemiseksi siirron jälkeen muodostunut virussekoitus hajotetaan uuteen Ebtr-soluviljelmään. Useimmissa tapauksissa näin kehittyvät erilliset viruspopulaatiot (plakit) ovat peräisin yhdestä viruksesta. BHV-1:n Lam-kannan gE-häviämämutanttien eristämiseksi eristettiin 230 tällaista plakkia ja tutkittiin standardinmukaisilla immunologisilla menetelmillä BHV-1-spesifisten monoklonaalisten vasta-aineiden (Mab:t) kanssa, jotka eivät reagoi Difivac-1:llä infektoidujen solujen kanssa. Nämä monoklonaaliset vasta-aineet suuntautuvat glykoproteiini gE:tä vastaan. Mainituista 230 plakista viisi ei reagoanut näiden monoklonaalisten vasta-aineiden kanssa. Näiden 5 plakin DNA:ta tutkittiin tarkemmin.

c) BHV-1:n Lam-kannan konstruoidujen gE-häviämämutanttien DNA-analyysi

Yllämainituista 5 gE-häviämämutanttiehdokkaasta kolmen (1B7, 1B8, 2H10) DNA-valmisteita tutkittiin edelleen käyttäen standardinmukaista Southern blot -analyysimenetelmää (Sambrook ym. 1989). Nämä DNA-valmisteet pilkottiin kahteen kertaan PstI:llä ja DraI:llä, minkä jälkeen tehtiin geelisähköforeesi ja Southern blot -hybridisaatio käyttäen koettimena 2,3 kb:n pituista PstI-DraI-häviämäjaksoa. Tulokset osoittivat, että viruspopulaatioiden 1B7 ja 1B8 perimän gE-geeni on poistettu täsmälleen halutulla tavalla; ks. Fig. 7A ja 7B. Populaatiossa 2H10 on poikkeava PstI-DraI-jakso. gE-spesifisellä koettimella tehdyt Southern blot -hybridisaatiot osoittivat, että missään näistä kolmesta

DNA-valmisteesta ei ole gE- sekvenssejä (tuloksia ei ole esitetty). BHV-1:n viruspopulaatiot 1B7 ja 1B8 ovat aiottuja rekombinoituja gE-häviämämutantteja. BHV-1:n viruspopulaation 1B7 rokotusominaisuuksia on testattu.

5

d) Tymidiinikinaasi/gE-kaksoishäviämämutanttien konstruoiminen

Koska BHV-1:n rekombinoidut häviämämutantit, joissa on häviämä ainoastaan yhdessä geenissä, eivät ehkä ole riittävästi taudinaiheut-
tamiskyvyltään heikennettyjä, häviämät tehtiin myös BHV-1:n Lam- ja Harbe-
rink-kantojen tymidiinikinaasi (TK) -geeniin. Nämä mutantit konstruoi-
samalla menetelmällä, jota käytettiin edellä mainittujen gE-häviämämutanttien
yhteydessä (tuloksia ei ole esitetty). Näitä TK-häviämämutantteja on käytetty
TK/gE-kaksoishäviämämutanttien konstruomiseksi.

15

e) Glykoproteiini gI/glykoproteiini gE-kaksoishäviämämutanttien
konstruoiminen

Koska yhdellä gE-häviämämutantilla rokotettu karja saattaa tuottaa anti-gI-
vasta-aineita, jotka voivat häiritä anti-gI/gE-vasta-aineiden tunnistamista (tätä
käsittellään jäljempänä), keksimme myös rokotteen, jossa on gI/gE-kaksois-
häviämä. Tällainen gI/gE-kaksoishäviämämutantti voidaan konstruoida käyt-
tämällä samoja menetelmiä, joita on käytetty gE-yksittäishäviämämutantin
konstruomisessa. 1,8 kb:n pituisen PstI-jakson alkupään – joka kattaa gE-
geenin 5'-pään – osittainen nukleotidisekvenssianalyysi paljasti avoimen luku-
kehyksen, jolla on merkittävää homologiaa muissa herpesviruksissa tavattujen
gI-homologioiden kanssa (ks. Fig. 13 ja 14). gI/gE-häviämäjakso voidaan kon-
struoida käyttäen 350 bp:n pituista SmaI-PstI-jaksoa, joka käsittää gI-geenin
oletetun 5'-pään ja EcoNI-SmaI-jakson, joka sijaitsee jäljempänä gE-geenissä.
Tämä jakso voidaan rekombinoida villin tyypin perimän kanssa, jolloin
saadaan BHV-1:n gI/gE-häviämämutantti (ks. Fig. 16). Ne 80-90 amino-
happoa, jotka – teoriassa – voidaan vielä muodostaa, eivät kykene tuomaan
esiin vasta-aineita, jotka voivat häiritä anti-gI/gE-vasta-aineiden havaitsemista.
gI-geenin sekvenssin jatkotutkimukset mahdollistavat sellaisen gI-häviämän
konstruomisen, joka kattaa täydellisen gI-koodausalueen. Tälle gI/gE-
kaksoishäviämämutantille annettiin nimitys Difivac-IE.

- f) Lam gE⁻ ja Lam gE⁻,TK⁻ -mutanttien turvallisuuden ja tehokkuuden arviointi

5 BHV-1:n mutanttikantojen Lam gE⁻ ja Lam gE⁻, TK⁻ rokotusominaisuuksia testattiin 7 viikon ikäisissä BHV-1-seronegatiivisissa vasikoissa, joilla ei esiintynyt spesifisiä taudinaiheuttajia. Kutakin mutanttikantaa ruiskutettiin 6 vasikalle nenänsisäisesti. Kullekin vasikalle annettiin kokonaisannos, jossa oli 10^5 TCID₅₀ 2 ml:ssa elatusainetta ja josta 1 ml ruiskutettiin kumpaankin sieraimen. Verrokkeina toimiville rokottamattomille 6 vasikalle ruiskutettiin 10 nenänsisäisesti elatusainetta, jossa ei ollut virusta. Viiden viikon kuluttua 10 rokottamisesta kaikki vasikat, rokotetut ja rokottamattomat, altistettiin antamalla nenänsisäisesti 10^7 TCID₅₀ BHV-1:n hyvin voimakasta Iowa-kantaa. Rokottamisen jälkeen ja altistamisen jälkeen seurattiin kliinisiä oireita, peräsuolen lämpötilaa ja ruhon painoa. Sieraimista otettiin vanutupponäytteet, 15 joiden avulla määritettiin viruksen nenästä erittymisen kesto vuorokausina.

Rokottamisen jälkeen vasikoiden käyttäytyminen, ruokahalu, peräsuolen lämpötila ja kasvu pysyi normaalina. Seerumin erittymistä nenästä ja pieniä nenän limakalvon haavaumia havaittiin kaikissa rokotetuissa vasikoissa. 20 Virusta voitiin eristää rokotettujen vasikoiden nenistä noin 7 päivän ajan (Taulukko 1).

Altistamisen jälkeen kaikissa rokottamattomissa verrokkivasikoissa ilmeni haluttomuutta, ruokahaluttomuutta, silmän ja nenän eritteiden vuotamista, 25 alaleuan ikenien punoitusta, vakavia nenän limakalvon haavaumia ja kasvun heikkenemistä. Kaikissa Lam gE⁻, TK⁻:lla rokotetuissa vasikoissa ilmeni jonkin verran nenän eritteiden vuotamista ja vähäisiä nenän limakalvon haavaumia. Kaikissa Lam gE⁻:llä rokotetuissa vasikoissa ei esiintynyt nenän eritteiden vuotamista tai nenän limakalvon haavaumia. Haluttomuutta, 30 ruokahaluttomuutta tai muita taudin kliinisiä oireita ei rokotetuilla vasikoilla esiintynyt. Peräsuolen lämpötila, kasvu ja kliiniset arvot altistamisen jälkeen on esitetty kuvissa 22, 23 ja 24. Rokottamattomat vasikat erittivät virusta nenän kautta 2 kertaa kauemmin kuin rokotetut vasikat (Taulukko 1).

35 Edellä esitetyt tulokset osoittavat, että BHV-1:n mutanttikannat Lam gE⁻ ja Lam gE⁻,TK⁻ aiheuttivat nuorissa vasikoissa tuskin mitään kliinisiä taudin

oireita. Kummatkin mutanttikannat estivät sairastumisen altistamisen jälkeen ja vähensivät virukset nenästä erittymisen kestoa 50 %:lla.

5 BHV-1:n mutanttikannat Lam gE⁻ ja Lam gE⁻,TK⁻ ovat turvallisia ja tehokkaita käyttää karjan rokottamiseen BHV-1-infektioita vastaan.

3. gE:n prokaryoottinen ilmentäminen

10 BHV-1:n glykoproteiini gE-geenin prokaryoottista ilmentämistä varten on tähän asti käytetty pGEX-ilmentämisvektoreita (D.B. Smith ja K.S. Johnson, Gene 67 (1988) 31-40). pGEX-vektorit koodaavat *Schistosoma japonicumista* saatavaa kantajaproteiinia glutationi S-transferaasi (GST), joka on tac-promootorin vaikutuksen alainen, joka voidaan indusoida ilmentämään isopropyylitiogalaktosidin (IPTG) avulla. Esimerkkinä GST-gE-fuusio-
15 proteiinista on rakennettu pGEX-2T600s3 (Fig. 8A). Tässä rakenteessa GST-geenin taakse sidottiin standardinmukaisia molekyylibiologisia menetelmiä käyttäen (Sambrook ym. 1989) 600bp:n pituinen SmaI-jakso, joka koodaa gE-proteiinin 200 aminohapon N-pään aluetta. Tämä rakenne suunniteltiin kolminkertaiseksi liittämällä kullakin kerralla GST:hen 600bp:n
20 pituinen jakso eri lukukehystä. Kaikki kolme rakennetta istutettiin *Escherichia coli*:n DH5 α -kantaan, ne indusoiitiin IPTG:llä ja muodostuneet proteiinit siirrettiin nitroselluloosaan sen jälkeen, kun Western blotting -menetelmällä oli tehty polyakrylamidigeelisähköforeesi. Anti-GST-vasta-aineiden avulla
25 tehty immunologinen havainnointi osoitti, että ainoastaan sopivan gE-proteiinin aluetta koodaavan lukukehysten (nro 3) avulla saadaan aikaan selvän fuusioproteiinin ilmentäminen, joka proteiini on ennustettua kokoa 27k (GST) + 20k (gE) = 47k. Kolme eristämäämme monoklonaalista vasta-ainetta, jotka eivät reagoi Difivac-1:n kanssa, tunnistavat 47 kD GST-gE-fuusio-
30 proteiinin Western blot -analyysissa; ks. Fig. 8B.

4. Glykoproteiinin gE geenin eukaryoottinen ilmentymä

35 Glykoproteiinin gE geenin eukaryoottiseksi ilmentämiseksi on tähän mennessä valittu mm. vektori pEVHis. Tässä pEVHis-vektorissa on eukaryoottisena merkitsimenä HisD-geeni, joka koodaa histidinolidehydrogenaasia [EC 1.1.1.23] (C. Hartmann ja R. Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8047-8051), joka saa solut elämään histidinolin tappavassa 2,5mM

konsentraatiossa. Lisäksi vektori käsittää ihmisen sytomegaloviruksen (HCMV) välittömän varhaisgeenin promoottorialueen, jonka takana ovat ainoat restriktioentsyymikohdat. pEVHis/gE-ilmentämisvektorin konstruoi-
 miseksi käytettiin jaksoa, joka käsittää glykoproteiinin gE geenin koko
 5 koodausalueen. Se alkaa AluI-kohdasta 55bp ennen gE:n oletettua avointa lukukehystä ja päättyy 133 bp sen takana. Tämä alue kloonattiin pEVHis-vektorin HCMV-promoottorin taakse, jolloin muodostui rakenne pEVHis/gE (Fig. 9). pEVHis/gE vahvistettiin *E. coli* DH5 α -soluissa ja puhdistettiin cesiumkloridigradientin avulla (Sambrook ym. 1989). Tämä puhdistettu DNA
 10 siirrettiin Balb/C-3T3-soluihin Grahamin ja Van der Ebin menetelmän mukaisesti. Muunnetut solut valittiin histidinolin avulla, minkä jälkeen voitiin eristää kaksikymmentä histidinolille resistenttiä pesäkettä. Nämä pesäkkeet tutkittiin Mab 81:n avulla käyttäen immunoperoksidaasiyksikerrosanalyysia (IPMA). Neljässä pesäkkeessä havaittiin gE-proteiini ilmentymä. Näistä
 15 neljästä pesäkkeestä käytettiin 3T3 gE-kloonin 9 korkean gE-ilmentymän omaavan alakloonin eristämiseen. Tällä menetelmällä eristettyä kloonin (nimitys 3T3gE 9.5) käytettiin mahdollisten monoklonaalisten anti-gE-vasta-aineiden tunnusmerkkien löytämiseen.

20 5. Sekä BHV-1:n glykoproteiinin gE että BHV-1:n glykoproteiinin gI eukaryoottinen ilmentymä samassa solussa

BHV-1:n glykoproteiinin gI ilmentämiseksi samassa solussa kuin BHV-1:n glykoproteiini gE määriteltiin aluksi BHV-1:n gI-geenin oletettava sijainti-
 25 kohta. Koska *herpes simplex* -viruksen glykoproteiini gI-geeni sijaitsee aivan ennen glykoproteiini gE-geeniä, pääteltiin, että BHV-1:n gI-geeni voisi sijaita vastaavalla kohdalla. Tämän testaamiseksi sekvenssistä määriteltiin 283 nukleotidin alue, joka sijaitsee n. 1 kb BHV-1:n gE-geenin alkua ennen. Tämän alueen käsitteellinen käänös osoitti, että toinen lukukehys koodaa 94
 30 aminohapon sekvenssiä, joka on homologinen *herpes simplex* -viruksen glykoproteiinin gI kanssa (Fig. 13 ja 14). Koska homologinen segmentti on noin 80 aminohappoa aloituskoodonista, BHV-1:n gI-geenin avoimen lukukehysten oletettu alkukohta arvioidaan olevaksi noin 250 nukleotidia ennen sekventoitua aluetta. Tästä pääteltiin, että 1,7 kb:n pituinen SmaI-jakso,
 35 joka alkaa 400 nukleotidia ennen sekventoitua aluetta ja päättyy gE-geenin sisäpuolella, sisältäisi BHV-1:n geenin gI-geenin koko koodausalueen. Tämä 1,7 kb:n pituinen SmaI-osa on kloonattu eukaryoottiseen vektoriin MSV-neo

(ks. Fig. 15). Tämä vektori sisältää vahvan hiiren ja rotan sarkoomaviruspromootorin ja valitsingeeni neon, joka koodaa resistanssia antibiootista G-418-sulfaattia Geniticiin vastaan. Tuloksena syntynyt rakenne MSVneoGI on vahvistettu *E. coli* DH5 α -soluissa ja siirretty 3T3gE 9.5 -soluihin käyttäen Grahamin ja Van der Ebin menetelmää. Siirretyt solut valittiin käyttämällä 400 μ g Geneticiniä/ml elatusainetta, ja resistentit pesäkkeet eristettiin ja testattiin monoklonaalisten anti-gE-vasta-aineiden kanssa, jotka eivät reagoineet 3T3gE 9.5 -solujen kanssa. Tämän perusteella valittiin 3T3gE/gI R20-klooni, joka reagoi esim. Mab 66:n kanssa samoin kuin BHV-1:n villi tyyppi.

6. Monoklonaalisen anti-gE-vasta-aine-ehdokkaiden karakterisointi

BHV-1:n villiä tyyppiä vastaan tuotettiin monoklonaalisia vasta-aineita, joista tehtiin valinta, jos ne eivät reagoineet Difivac-1:llä altistettujen naudan sikiön henkitorven (Ebtr) solujen kanssa. Näistä monoklonaalisista vasta-aineista tutkittiin niiden reaktiivisuus

- a) Lam gE⁻ -häviämämutantin kanssa;
- b) edellä kuvatun prokaryoottisen ilmentymätuotteen kanssa Western blot -analyysissä;
- c) edellä kuvattujen gE:tä ilmentävien Balb/c-3T3-solujen kanssa;
- d) kohdassa c) mainittujen ja Difivac-1:llä infektoidujen solujen kanssa, ja
- e) gE/gI-kompleksia ilmentävien Balb/c-3T3-solujen kanssa.

Kohdissa a, c, d ja e mainituissa reaktiivisuustesteissä käytettiin immuno-peroksidaasiyksikerrosanalyysia (IPMA). Taulukossa 2 esitetyistä tuloksista käy ilmi, että on tuotettu monoklonaalisia vasta-aineita, jotka on kohdistettu gE:tä vastaan (nrot 2, 3, 4, 52, 66, 68, 72 ja 81), ja monoklonaalisia vasta-aineita (nrot 1, 51, 53, 67, 75 ja 78), jotka voidaan kohdistaa gE/gI-kompleksin vastaavia antigeenialueita vastaan. Eri monoklonaalisten vasta-aineiden tunnistamien antigeenialueiden kartoittamiseksi suoritettu kilpailu-IPMA tutkimus osoitti, että glykoproteiini gE:ssä on ainakin 4 antigeenialuetta ja että yhden alueen muodostaa todennäköisesti gE/gI-kompleksi (Taulukko 2).

Anti-gE-vasta-aineiden tunnistaminen BHV-1-tartunnan saaneessa karjassa

Sen tutkimiseksi, onko tartunnan saaneen karjan seerumissa gE:n vastaisia vasta-aineita, tehtiin epäsuora esto-IPMA-tutkimus 16 monoklonaalisella gE-vasta-aine-ehdokkaalla ja seuraavilla 8 valitulla seerumilla:

- 5 - 2 seerumia Difivac-1:llä rokotetuista ja virulentilla Iowa-kannalla altistetuista naudoista, joiden seerumit otettiin 14 päivää altistamisen jälkeen;
- 10 - 2 seerumia BHV-1:n alatyypin 1 viruksella kokeellisesti altistetuista naudoista, joiden seerumit otettiin 20 kuukautta altistamisen jälkeen. Toinen naudoista sai tartunnan kosketusaltistuksesta;
- 2 seerumia BHV-1:n alatyypin 2b viruksella altistetuista naudoista, joiden seerumit otettiin 20 kuukautta altistamisen jälkeen. Toinen naudoista sai tartunnan kosketusaltistuksesta;
- 15 - 1 seerumi vasikasta, jolla ei esiintynyt spesifisiä taudinaiheuttajia ja joka rokotettiin ts-mutantitirokotteella, altistettiin 3 viikkoa myöhemmin BHV-1:n alatyypin 2b virukselle ja jonka seerumia otettiin 7 viikon kuluttua altistamisesta;
- 20 - 1 seerumi gnotobioottisissa olosuhteissa kasvatetusta vasikasta, joka rokotettiin ts-mutantitirokotteella, altistettiin 3 viikkoa myöhemmin BHV-1:n alatyypin 2b virukselle ja jonka seerumia otettiin 7 viikon kuluttua altistamisesta.

25 Taulukosta 2 käy ilmi, että kaikki nämä seerumit sisälsivät vasta-aineita gE:n antigeenialueita III ja IV vastaan ja antigeenialuetta I vastaan, joka sijaitsee todennäköisesti gE/gI-kompleksissa. Voidaan päätellä, että gE on ilmeisesti sopiva serologinen merkitsin BHV-1-tartunnan saaneiden ja rokotettujen nautaeläinten erottamiseksi.

30

7. BHV-1:n nukleiinihappojen tunnistaminen PCR-määrityksen avulla käyttäen BHV-1:n gE-spesifisiä alukkeita

35 BHV-1:n gE-geenin määrittäystä nukleotidisekvenssistä lähtien valittiin PCR-määritykseen sopiva alukepari käyttäen Lowen ym. kehittämää alukevalintaohjelmaa (T. Lowe, J. Sharefkin, S. Qi Yang ja C.W. Dieffenbach, 1990, Nucleic Acids Res. 18, 1757-1761). Näille alukkeille annettiin

nimitykset P₃ ja P₄, ja ne on esitetty kuvassa 10. Alukkeet sijaitsevat 159 nt:n etäisyydellä toisistaan ja johtavat 200 nukleotidin muodostaman jakson vahvistamiseen. Alukkeita P₃ ja P₄ ja eristettyä BHV-1:n DNA:ta käyttäen olosuhteet optimoitiin PCR-määrittystä varten. Tämä edellytti erityisesti

5 MgCl₂-konsentraation, glyserolipitoisuuden ja kierto-olosuhteiden vaihtelumahdollisuutta. P₃:n ja P₄:n käyttöä varten BHV-1:n DNA:n vahvistamiseksi löydetty optimaalinen puskuri on 10 mM Tris, pH 8,0, 50 mM KCl, 0,01% gelatiinia, 2,6mM MgCl₂ ja 20% glyserolia. Löydetyt optimaaliset kierto-olosuhteet (Perkin Elber Cetus DNA Thermal Cyclor) ovat 1.-5. kierroille: 1

10 min 98°C, 30 s 55°C ja 45 s 72°C ja 6.-35. kierroille: 30 s 96°C, 30 s 55°C ja 45 s 72°C. PCR-vahvistamisen jälkeen saatu 200 nukleotidin DNA-jaksolle tehtiin 2 % agarosigeelillä sähköforeesi, blotattiin nitroselluloosalla ja tämän jälkeen sille suoritettiin Southern blot -analyysi. Southern blot -analyysissä käytetty ³²P dCTP -leimattu koetin on 137 bp:n pituinen TaqI-jakso, joka

15 sijaitsee alukkeiden sidoskohtien välissä (Fig.10). Hybridisoitujen suodattimien autoradiografian jälkeen havaittiin 200bp:n pituinen nauha. Tällä menetelmällä ainoastaan 10 BHV-1:n perimän (noin 1,5 x 10⁻¹⁵ µg DNA:ta) vahvistus vielä synnyttää selvästi havaittavan signaalin (tulosta ei esitetty). Vastaavasti kehitettiin PCR-menetelmä, jossa käytettiin alukkeita, jotka

20 perustuvat BHV-1:n glykoproteiinin gIII koodaussekvenssiin (D.R. Fitzpatrick, L.A. Babiuk ja T. Zamb, 1989, Virology 173, 46-57). Jotta voitaisiin erottaa BHV-1:n villin tyypin DNA ja gE-häviämämutantitirokote toisistaan, DNA-näytteille tehtiin sekä gE-spesifinen PCR-analyysi että gIII-spesifinen PCR-analyysi. Tässä testissä Difivac-1:n DNA-valmiste havaittiin

25 gIII-positiiviseksi ja gE-negatiiviseksi.

Koska BHV-1 DNA:n havaitseminen naudan siemennesteessä on yksi tärkeä BHV-1-spesifisen PCR-menetelmän käyttömuoto, BHV-1:llä infektoituneelle naudan siemennesteelle pyrittiin tekemään gE-spesifinen PCR-analyysi.

30 Siemenenesteen tuntemattomilla komponenteilla on kuitenkin voimakkaasti polymeraasiketjureaktiota estävä vaikutus. Tämän vuoksi kehitettiin menetelmä BHV-1 DNA:n eristämiseksi naudan siemennesteestä. DNA eristetään naudan siemennesteestä inkuboimalla 30 µl siemennestettä 1 mg/ml:lla proteinaasi K:ta (pK) kokonaistilavuudessa 300 µl 0,15M NaCl, 0,5

35 % Na-Sarkosyliä ja 40 mM DTT:tä, 60 °C:ssa. 1 tunnin kuluttua näytteen annetaan jäähtyä huoneenlämpötilaan, jolloin lisätään 300 µl 6M NaI:tä ja inkuboidaan 5 min ajan. Tästä seoksesta DNA eristetään standardinmukaisella

- 5 kloroformi/isoamyylietanoli-uutolla ja saostetaan 1 tilavuusyksiköllä isopropanolia. Seos pestään 2,5 moolilla NH_4Ac /70 % etanolia ja suspendoidaan uudelleen 10 millimooliin Tris:iä, jonka pH-arvo on 7,4, ja jossa on 1mM EDTA:ta, 0,5 % Tween 80:tä ja 0,1 mg/ml proteinaasi K:ta, ja inkubointi suoritetaan toisen kerran 1 tunnin ajan 60°C:ssa. Tälle DNA-valmistelle voidaan tehdä suoraan polymeraasiketjureaktio (PCR).

Piirustusten kuvaus

10 Kuva 1: BHV-1-kantojen Difivac-1 ja Iowa Southern blot -analyysi

- A. Piirustuksessa on esitetty Difivac-1:n ja Iowan perimän DNA:n Southern blot -autoradiodiagrammi. Väyliin 1 ja 3 lisättiin Difivac-1:n DNA:ta HindIII:n ja PstI:n restriktioentsyymipilkonnan jälkeen, vastaavassa järjestyksessä. Väyliin 2 ja 4 lisättiin Iowan DNA:ta HindIII:n ja PstI:n restriktiopilkonnan jälkeen vastaavasti. Osion koko on esitetty kiloemäksinä (kb).

- 20 Viruksen DNA eristettiin sentrifugoimalla viruksella infektoituja Ebtr-soluja elatusaineessa (70 ml / n. 450 cm²:n rullauspullo) noin 2h ajan 25 % (paino-%) sakkaroosityynyn läpi, 10 mM Trisiä, jonka pH oli 7,4, 150mM natriumkloridia ja 1 millimoolissa EDTA:ta 20 krpm:n nopeudella Beckman L5-65 ultrasentrifugointilaitteen SW27-roottorissa. Näin saadusta viruspallosta eristettiin DNA standardinmukaisilla menetelmillä (J. Sambrook, E.F. Fritsch ja T. Maniatis, 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2. painos, toim. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). Tälle DNA:lle tehtiin restriktioentsyymipilkonnat Boehringer-Mannheimin entsyymeillä saman valmistajan SuRE/cut-puskureissa.

- 30 Vaakasuorassa elektroforeesissa 0,7-prosenttisessä agarosigeelissä tehdyn eristyksen ja nitroselluloosasuodattimelle (Schleicher & Schuell, Inc.) tehdyn blottauksen jälkeen suodatin esihybridisoitiin 6 h ajan 42°C:n lämpötilassa liuoksessa, jossa oli 50 % formamidia, 3x SSC (1x SSC = 0,15 M NaCl ja 0,015 M Na-sitraattia, pH 7,4), 50 µl denaturoitua lohen sperman DNA:ta (Sigma)/ml ja 0,02 % naudan seerumin albumiinia, 0,02 % polyvinyylipyrrolidonia ja 0,02 % ficollia ja 0,1 % Na-dodekyylisulfaattia (SDS). Tämän jälkeen suoritettiin hybridisaatio lisäämällä samaan liuokseen

- ³²P dCTP (Amersham) -leimattua HindIII K-jaksoa (HindIII K-jakson valinta perustuu artikkeliin: Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain), John F. Mayfield, Peter J. Good, Holly J. VanOort, Alphonso R. Campbell ja David A. Reed, Journal of Virology (1983) 259-264). 12-14 h hybridisaation jälkeen suodatin pestiin 2 h ajan 0,1-prosenttisessa SDS:ssä ja 0,1 x SSc:ssä 60°C:n lämpötilassa. HindIII K-jakso kloonattiin pUC18-vektoriin standardinmukaisten kloonausmenetelmien mukaan (J. Sambrook, E.F. Fritsch ja T. Maniatis, 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).
- 10 pUC/8,4 HindIIK-kloonin HindIII-pilkonnan jälkeen pUC18-vektori erotettiin uudelleen 8,4 kb HindIII K-jaksosta elektroforeesilla, jossa käytettiin 0,7-prosentista "Low Melting Point Agarose" -geeliä (BRL, Life Technologies, Inc.), ja vektori eristettiin agarosista standardinmukaisilla fenoliuuttamis- ja etanolisaostamismenetelmillä. Eristetty HindIII K-jakso
- 15 merkittiin Boehringer-Mannheim Random Primed DNA -leimausvälineistön 1004.760 avulla. Hybridisoiduille suodattimille tehtiin autoradiografia valottamalla 36 h ajan Kodak XAR -filmiä -70 °C:ssa ja käyttämällä heijastavaa ruutua.
- 20 B. Iowa-kannan 8,4 kb:n pituisen HindIII K-jakson ja Difivac-1:n 7,4 kb:n pituisen HindIII K-jakson fyysiset kartat. Ottaen huomioon, että 6 kb:n pituiset PstI-jaksot kulkeutuvat yhdessä ja että Difivac-1:n 1,8 kb:n pituinen PstI-jakso on poissa, häviämä on todennäköisesti kuvan vinoviivoitetulla alueella.
- 25 Kuva 2: BHV-1:n villin tyypin jaksojen alakloonaus Difivac-1:stä puuttuvan alueen ympärillä
- Kuvassa A on esitetty BHV-1:n genomien osat: Unique Long (U_L) -alue,
- 30 Unique Short (U_S) -alue ja kaksi toisintoa (Ir ja Tr). Tämä kartta perustuu Cooper-kannasta julkaistuun analyysiin (John F. Mayfield, Peter J. Good, Holly J. VanOort, Alphonso R. Campbell ja David A. Reed, Journal of Virology (1983) 259-264).
- 35 Kuvassa B on esitetty U_S -alueen jaksoja, jotka on kloonattu prokaryoottisiin vektoreihin: 15,2 kb:n pituinen EcoRI-jakso pACYC:ssa, 8,4 kb:n pituinen HindIII-jakso pUC18:ssa ja 2,7 kb:n ja 4,1 kb:n pituinen EcoRI-HindIII-jakso

- pBR322:ssa. Viruksen DNA-jaksojen eristäminen tehtiin menetelmillä, jotka on mainittu kuvan 1A yhteydessä. Näiden jaksojen kloonaukseen eri vektoreille tehtiin standardinmukaisilla menetelmillä (J. Sambrook, E.F. Fritsch ja T. Maniatis, 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).

Kuvassa C on esitetty fyysinen kartta alueesta, johon Difivac-1:n oletettu häviämä on paikannettu.

- 10 Kuvassa D on esitetty joitakin em. alueen alaklooneja, joita on käytetty jatkoanalyysissä. Kaksi PstI-jaksoa kloonattiin pKUN19-vektoriin ja muut osat pUC18-vektoriin.

Kuva 3

- 15 A: BHV-1:n Lam-kannan U_S-alueen 2027 nukleotidin muodostama nukleotidisekvenssi oletetun kohdan ympärillä, joka on hävinnyt Difivac-1:stä, kuten kuvassa 2C on esitetty [äärimmäisenä vasemmalla olevasta AluI-tunnistuskohdasta äärimmäisenä oikealla olevaan HincII-tunnistuskohtaan].
- 20 Kuvassa 2D esitettyjen alakloonien siirrännäisten nukleotidisekvenssit määritettiin analysoimalla kahta säiettä käyttämällä Sangerin ym. dideoksisekvenssimenetelmää (F. Sanger, S. Nicklen ja A.R. Coulson, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467). Tätä tarkoitusta varten käytettiin Pharmacia T7-sekvenssivälineistöä valmistajan esittämällä tavalla.
- 25 Radioaktiivista leimausta varten käytettiin [³⁵S] dATP:tä (Amersham). GC-pitoisten alueiden ja yhteenpuristettujen keinotekkoisten rakenteiden sekvenssianalyysi toistettiin Pharmacia-välineistön 7-deatsa-dGTP-variantilla. Nukleotidisekvenssin alapuolella on kolmikirjaimisen koodin muodossa esitetty 575 aminohappotähteen avoimen lukukehyksen aminohapposekvenssi,
- 30 joka löydettiin nukleotidisekvenssin käsitteellisen käännöksen jälkeen. Tämä transkriptio perustuu vallitsevaan koodiin ja määritettiin käyttäen PC/geeni-tietokoneohjelmaa (PC/gene versio 1.03, marraskuu 1987). Tämä 575 aminohapon avoin lukukehys alkaa methioniinilla nukleotidin 168 kohdalla ja päättyy lopetuskoodoniin nukleotidin 1893 kohdalla.
- 35 575 aminohapon avoimen lukukehyksen rakenneanalyysi suoritettiin myös PC/geeni-tietokoneohjelman avulla. Ensimmäiset 26 aminohappoa

muodostavat eukaryoottisen vientisignaalin, joka on kuvassa merkitty "signaaliptidinä". Tuloksella 6,2 tämän signaalsekvenssin ennustetaan katkeavan aminohappojen 26 ja 27 välistä. 575 aminohapon sekvenssissä on kolme mahdollista N-sidoksista glykosylaatiokohtaa (NXT/S), joita on merkitty aminohappotähteiden alle merkityllä viivalla. Raon ja Argosin menetelmän mukaan aminohappojen 423 ja 450 välissä on membraanin läpäisevä alue, jota on merkitty kuvassa "membraanin läpäisevänä kierukkana". Restriktioentsyymien AsuII, SmaI, HindIII ja EcoNI tunnistussekvenssit (kohdat) on alleviivattu. Tämän polypeptidin laskettu molekyylipaino on 61212.

B: Edellä mainittujen 575 aminohapon avoimen lukukehysten rakenteellisten tunnusmerkkien esitys kaaviona

15 Kuva 4: BHV-1:n gE-geenin aminohapposekvenssin ja herpes simplex -viruksen (HSV) gE-geenin ja muiden gE-homologisten geenien [*pseudorabies virus* (PRV) gI ja *varicella-zoster* (VZV) gPI] aminohapposekvenssin vertailu

Tämän vertailun sekvenssit on otettu seuraavista julkaisuista:

- 20 HSV: Sequence determination and genetic content of the short unique region in the genome of *herpes simplex* virus type 1. D.J. McGeoch, A. Dolan, S. Donald ja F.J. Rixon (1985), Journal Mol. Biol. 181, 1-13.
- VZV: DNA sequence of the U_S component of the *varicella-zoster* virus genome. A.J. Davidson (1983), EMBO Journal 2, 2203-2209.
- 25 PRV: Use of Agt11 to isolate genes for two *pseudorabies* virus glycoproteins with homology to *herpes simplex* virus and *varicella-zoster* virus glycoproteins. E.A. Petrovskis, J.G. Timmins ja L.E. Post (1986) Journal of Virology 60, 185-193.

30 Näitä sekvenssejä verrattiin käyttämällä sekvenssianalyysiohjelmaa Multalin (F.Corpet, 1988, Nucl. Acids Res. 16, 10881-10890).

35 Kuvassa A on esitetty diagrammi, jossa kaikki neljä aminohapposekvenssiä on esitetty kaaviollisesti. Tässä esitetyt membraanin läpäisevät osat (TM) on esitetty allekkain. Ennustettujen vientisignaalsekvenssien (SP) ja mahdollisten N-sidoksisten glykosylaatiokohtien (I) lisäksi on esitetty kaksi säilytettyä aluetta, joissa kysteiinitähteiden suhteellinen asema pysyy usein muuttumattomana (C C C).

Kuvassa B on esitetty neljän gE-version keskellä sijaitsevan kysteiinipitoisen alueen Multalin-vertailu. Tähdellä on merkitty identtisiä aminohappoja ja kaksoispisteellä analogisia aminohappoja.

5

Kuva 5: Difivac-1:n ja Iowa-kannan Southern blot -analyysistä saatujen valokuvien perusteella tehty piirustus

10 Kuva A: Difivac-1:n ja Iowa-kannan perimien restriktioentsyymipilkonnat BstI:llä (1, 2), EcoRI:llä (3, 4) ja HindIII:lla (5, 6), eristetty 0,7-prosenttisella agarosigeelillä, blotattu nitroselluloosalla ja hybridisoitu BHV-1:n Lam-kannan ³²P-leimatus HindIII K-jakson kanssa käyttäen menetelmiä, jotka on esitetty kuvan 1A yhteydessä.

15 Kuva B: Em. geelin nitroselluloosablottaus, joka on hybridisoitu BHV-1:n gE-spesifisellä p318-koettimella. Tämä näyte käsittää koko AluI-HincII-alueen, joka on esitetty kuvassa 2C.

Kuva 6: BHV-1:n gE-häviämäjakson konstruointi

20

Kuvassa A on esitetty gE-geenin ja käytettyjen kloonien sijaintikohta. BHV-1-perimän komponentit ovat: Unique Long (U_L) -osa, Unique Short (U_S) -osa ja kaksi toisintoa (Ir ja Tr). gE-geenin 5'-puolella sijaitseva alue saatiin seuraavasti: BHV-1:n Lam-kannan 8,4 kb:n pituisen HindIII K-jakson 1,4 kb:n pituinen PstI-SmaI-jakso alakloonattiin plasmidin pUC18 SmaI- ja PstI-kohtiin. Tälle kloonille annettiin nimitys p515, ja se on esitetty kuvassa B. 4,1 kb:n pituisesta HindIII-EcoRI-kloonista saatu, gE:n 3'-puolella sijaitseva EcoNI-SmaI-osa kloonattiin p515:n ainoaan AsuII-kohtaan. Jotta EcoNI-tähteen sitominen AsuII-tähteeseen olisi mahdollista, kloonin p515 pilkottiin AsuII:n kanssa ja käsiteltiin tämän jälkeen Klenowin entsyymillä (Boehringer-Mannheim) ja dCTP:llä, jolloin AsuII-tähteeseen saatiin yksi sytosiinitähde standardinmukaisilla menetelmillä (Sambrook ym. 1989). Tätä lisäsytosiinia on merkitty tähdellä kuvassa D. Tämän jälkeen p515 pilkottiin myös SmaI-entsyymillä, minkä jälkeen EcoNI-jakso voitiin sitoa tähän vektoriin. Näin konstruoidulle kloonille annettiin nimitys p519.

35

Kuva 7

- 5 A: DNA-valmisteiden 1B7, 1B8 ja 2H10 Southern blot -analyysistä
saadun valokuvan perusteella tehty piirustus. DNA:n eristys,
restriktioentsyymipilkonnat, blottaus ja hybridisaatio tehtiin menetelmillä,
jotka on esitetty kuvan 1A selostuksen yhteydessä. Kun DNA-valmisteille
1B7, 1B8 ja 2H10 oli tehty kaksinkertainen PstI-DraI-pilkonta, jaksot
erotettiin 0,7-prosenttiseen agarosigeeliin ja tämän jälkeen blotattiin
nitroselluloosasuodattimella. Tämä suodatin hybridisoitiin koettimena
10 käytetyllä ^{32}P dCTP -leimatulla 2,3 kb:n pituisella PstI-DraI-häviämäjaksolla.
Väylillä 1-3 näytteet 1B7, 1B8 ja 2H10 erotettiin vastaavassa järjestyksessä.
Väylällä 4 käytettiin Lam-kannasta saatua villin tyyppin BHV-1-DNA:ta ja
väylällä 5 2,3 kb:n pituista häviämäjaksoa.
- 15 B: BHV-1:n Lam-kannan 15,2 kb:n pituisen EcoRI-osan fyysinen kartta.
Kartassa on esitetty PstI-, DraI- ja HindIII-tunnistuskohtien sijainti ja
kohdassa 7A mainitun hybridisaationäytteen sijainti.

Kuva 8: BHV-1:n gE-geenin prokaryoottinen ilmentyminen

- 20 BHV-1:n gE:n prokaryoottisen ilmentymisen aikaansaamiseksi gE-geenin 600
bp:n pituinen SmaI-jakso fuusioitiin kolmena lukukehyksenä Schistosoma
japonicum glutathioni-S-transferaasigeenin koodausalueelle vektorissa
pGEX-2T (D.B. Smith ja K.S. Johnson, Gene 67 (1998) 31-40).
- 25 Rekombinaatiomolekyylit, joissa on SmaI-jakson oikea (syn) orientaatio,
tunnistettiin rajoitusentsyymianalyysillä käyttäen standardinmukaisia
menetelmiä. Tämän fuusiorakenteen omaaville *E. coli* DH5 α -klooneille
annettiin nimitykset pGEX-2T600s1, pGEX-2T600s2 ja pGEX-2T600s3.
- 30 A: Yhden pGEX-2T600-rakenteen diagrammi. GST-gE-fuusiotuotetta
koodaavan alueen NH₂-puolella sijaitsee isopropyylitiogalaktosidin (IPTG)
indusoima tac-promoottorialue.
- 35 B. pGEX-2T600s:illä transformoitujen DH5 α -solujen
kokonaisproteiinivalmisteiden Western blot -analyysistä saatujen valokuvien
perusteella tehty piirustus. Yön yli viljeltyjä pGEX-2T600s1, pGEX-2T600s2
ja pGEX-2T600s3 -rakenteilla siirrettyjä DH5 α -soluviljelmiä jatkettiin 1/10

Luria-Bertani (LB) -väliaineessa, jossa oli 50 µg/ml ampisilliiniä, ja 1 h kasvun jälkeen niitä indusoiitiin IPTG:llä 5 h ajan. Näitä indusoituja viljelmiä sentrifugoitiin 5 min nopeudella 6000 x g ja lisättiin 1 x kerrosseokseen (2 % SDS, 10 % glyserolia, 5 % merkaptotetanolia ja 0,01 % bromofenolisinistä) [1,5 ml viljelmää 500 µl:ssa kerrosseosta] ja kuumennettiin 95°C:ssa 5 min ajan. Tämän jälkeen 50 µl väylää kohti erotettiin pystysuoralla 12,5-prosenttisella polyakryyliamidigeelillä standardinmukaisilla menetelmillä ja sitten blotattiin puolikuivalla menetelmällä nitroselluloosasuodattimeen käyttäen LKB-multiphor II Nova Blot -järjestelmää valmistajan määrittämissä olosuhteissa.

Väylillä M käytettiin esivärjättyä merkitsinproteiinia (BRL Life Technologies, Inc. 236k, 112k, 71k, 44k, 28k, 18k ja 15k) ja väylillä 1, 2 ja 3 vastaavasti kolmella kehyksellä pGEX-2T600s1, pGEX-2T600s2 ja pGEX-2T600s3 siirrettyjen DH5α-solujen kokonaisproteiinivalmisteita.

Kentässä A voidaan nähdä anti-GST-seerumilla tehdyn Western blot -analyysin tulos. Tätä analyysia varten suodatinta inkuboitiin standardinmukaisilla menetelmillä (E. Harlow ja D. Lane, 1986, Antibodies: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) estopuskurissa (PBS + 2 % maitojauhetta ja 0,05 % Tween 20:ta) ja tämän jälkeen polyklonaalisessa kaniinin anti-GSP-seerumissa. Suodatin pestiin ja inkuboitiin piparjuuriperoksidaasilla (HRPO) konjugoidun vuohi-anti-kaniini-immunoglobuliiniseerumin kanssa. Tämän jälkeen sitoutuneet vuohen vasta-aineet tunnistettiin immunokemiallisesti kromogeenillä (diaminobentsidiini, kloronaftoli ja H₂O₂). GST-fuusiotuotteella, joka on merkitty nuolella, on n. 47 k arvioitu koko vain ruudussa 3.

Kentässä B voidaan nähdä gE-proteiinin tunnistavalla monoklonaalisella vasta-aineella Mab 4 tehdyn Western blot -analyysin tulos. Tätä analyysia varten kentän A mukainen duplo-suodatin estettiin, inkuboitiin monoklonaalisella vasta-aineella, pestiin ja inkuboitiin HRPO-konjugoidulla kaniini-anti-hiiri -seerumilla. Tämän jälkeen sitoutuneet kaniinin vasta-aineet tunnistettiin immunokemiallisesti kromogeenillä. Väylällä 3 (rakenne 3) näkyvä nauha on kooltaan 47 k, ja se on merkitty nuolella.

Kuva 9: pEVHisgE:n konstruoiminen BHV-1:n gE-geenin eukaryoottista ilmentymistä varten

gE-geenin eukaryoottista ilmentymistä varten kloonattiin koko gE:n
 5 koodausalue oikeassa suunnassa ilmentämisvektorin pEVHis HCMV-
 promoottorialueen taakse käyttäen standardinmukaisia menetelmiä (Sambrook
 ym. 1989). Tätä tarkoitusta varten 394 bp:n pituinen AluI-osa, joka alkaa 55
 bp ennen gE:n avointa lukukehystä, kloonattiin pUC18:aan, ja sille annettiin
 nimitys p201. Kun p201 oli HincII-pilkottu, 1740 bp:n pituinen HincII-jakso,
 10 joka käsittää suuremman osan gE-geeniä, kloonattiin p201:een. Tästä syntyi
 tuloksena plasmidi p318, joka pUC18:n monisidoksessa käsittää koko gE-
 geenin koodausalueen 55 bp ennen gE:n aloituskoodonia olevasta AluI-
 kohdasta HincII-kohtaan, joka sijaitsee 133 bp gE:n lopetuskoodonin takana.
 Vektorin monisidoksessa olevia restriktioentsyymikohtia käyttäen tämä jakso
 15 leikattiin p318:sta entsyymeillä BamHI ja SphI. Ensin p318 pilkottiin SphI:lla
 ja tämän jälkeen SphI-kohta täytettiin käyttäen Klenowin polymeraasia ja
 dNTP:itä. BamHI-pilkonnan jälkeen 1,9 kb:n pituinen siirrännäinen erotettiin
 pUC18-vektorista alhaisen sulamispisteen omaavassa agarosissa (Low
 Melting Point Agarose) ja sidottiin pEVHis-vektorissa, joka oli pilkottu
 20 BamHI:lla ja EcoRV:lla kanssa tätä tarkoitusta varten. Näin muodostetulle
 plasmidille annettiin nimitys pEVHis/gE.

Kuva 10: gE-spesifisten alukkeiden ja koettimien sijainti PCR-menetelmässä BHV-1:n DNA:n tunnistamiseksi

25 Kuvassa on esitetty BHV-1:n glykoproteiinin gE geenin
 nukleiinihapposekvenssi nukleotidistä 1272 nukleotidiin 2027 [sekvenssi on
 otettu kuvassa 3 esitetystä]. gE-spesifistä PCR-menetelmää varten käytetyille
 alukkeille annettiin nimitykset P₃ ja P₄. Alukkeiden P₃ ja P₄ on alleviivattu.
 30 P₃:n nukleotidisekvenssi on 5'-ACG-TGG-TGG-TGC-CAG-TTA-GC-3'
 (SEQ ID NO:2). P₄:n nukleotidisekvenssi on (edellä määritellyn alukkeen
 sidossekvenssin komplementti) 5'-ACC-AAA-CTT-TGA-ACC-CAG-AGC-
 G-3' (SEQ ID NO: 3). Koetin, jota käytettiin Southern blot -hybridisaatiossa
 PCR-vahvistetun DNA:n tunnistamiseksi, on 137 bp:n pituinen TaqI-jakso,
 35 joka sijaitsee alukkeiden sidoskohtien välissä, jolloin tämän jakson päät on
 esitetty. Jotta voidaan tehdä vertailuja kuvaan 3 nähden, on myös esitetty
 HindIII- ja EcoNI-kohdat.

Kuva 11: Difivac-1:n gE-häviämän kartoitus

Kentässä A on esitetty fyysinen kartta BHV-1:n villin tyyppin Lam-kannan EcoRI-jaksosta, jonka pituus on 15,5 kb. Kentässä B on esitetty fyysinen kartta Difivac-1:n EcoRI-jaksosta, jonka pituus on 14,5 kb. Kummatkin EcoRI-osat kattavat vastaavien virusten perimien ainoat lyhyet alueet (Unique short regions) kokonaan. gE-geenin asema ja gI-geenin oletettu asema on osoitettu avoimin laatikoin. Kartat A ja B on sijoitettu siten, että kummassakin kartassa 6 kb:n pituiset PstI-jaksot ovat kohdakkain. Kummassakin kartassa sisäiset toisintosekvenssit ja lopussa olevat toisintosekvenssit on osoitettu vinoviivoitetuin laatikoin. Toisintojen alapuolella olevat nuolet osoittavat näiden sekvenssien suuntaa.

Kentässä A on esitetty se osa U_S -aluetta, joka puuttuu Difivac-1-kannasta.

Kentässä C on esitetty gE-häviämän kartoittamiseksi ja B:ssä esitetyn fyysisen kartan aikaansaamiseksi käytettyjen kloonattujen Difivac-1-jaksojen sijainti. Kloonien p728, p737 ja p754 liitännäisten alapuolella olevat nuolet osoittavat alueita, joiden sekvenssi on kartoitettu rekombinaatiokohdan määrittämiseksi.

Lyhenteitä:

A = AluI, E = EcoRI, P = PstI, H = HindIII, r = rekombinaatiokohta, IR = sisäinen toisinto, TR = lopetustoisinto

Kuva 12: Difivac-1:n U_S -alueen täsmällisen rekombinaatiokohdan määrittäminen

Difivac-1-kannasta löydetyn gE-häviämän täsmällisten rajojen määrittämiseksi on kartoitettu kloonin p754 sekvenssi sekä kloonien p728 ja p737 päiden sekvenssi. Näiden kloonien liitännäiset on esitetty kuvassa 11. Käytetyt sekvenssien kartoitusmenetelmät on selostettu kuvan 3 selityksissä.

Kentässä A on esitetty AluI-PstI-jakson pääosan sekvenssistä. Tämä sekvenssi alkaa gE-geenin promoottorialueelta. Oletettu TATA-laatikko on alleviivattu. Rekombinaatiokohdassa r tämä promoottorialue fuusioituu sekvenssiin, joka on löydetty myös U_S -alueen vastakkaisesta kohdasta, nimeltään

käänteistoisinto. Tasmällinen rekombinaatiokohta on määritetty vertailemalla gE-promoottorialueelta löydettyä toisintoa U_S-alueen vastakkaisesta kohdasta löydetyn toisinnon kopioon. Kohtaa, jossa nämä sekvenssit poikkeavat, on kentässä B(I) merkitty r:llä. Samantapainen vertailu on tehty Difivac-1:stä löydetyn gE-promoottorisekvenssin ja villin tyypin Lam-kannasta löydetyn gE-promoottorin kesken. Kohtaa, jossa nämä sekvenssit poikkeavat, on kentässä B(II) merkitty samoin r:llä. Löydetyt rekombinaatiokohdat ovat samat.

10 Kuva 13: BHV-1:n gI-geenin osittainen sekvenssianalyysi

Käyttämällä BHV-1:n Lam-kannan 1,8 kb:n pituista PstI-kloonia, joka ulottuu BHV-1:n sekä gI- että gE-geeniin (ks. Fig. 11), määritettiin 284 nukleotidin sekvenssi BHV-1:n gI:n koodausalueella. Käytetyt sekvenssi-kartoitusmenetelmät on selostettu kuvan 3 selitysten yhteydessä. Sekvenssin käännös perustuu yleispätevään koodiin, ja se on tehty PC/genetietokoneohjelmalla versio 1,03 (marraskuu 1987). Toisen lukekehysten koodaama aminohapposekvenssi on esitetty yksikirjaimisina koodeina nukleotidisekvenssin alapuolella. Tämä aminohapposekvenssi on homologinen muiden herpesviruksen gI-homologiin koodausalueen kanssa (ks. Fig. 14).

25 Kuva 14: Oletetun BHV-1:n gI-geenin osittaisen aminohapposekvenssin aminohappovertailu herpes simplex -viruksen (HSV1) gI-geenin, pseudorabiesviruksen (PRV) gp63-geenin ja varicella-zoster-viruksen (VZV) gpIV-geenin koodausalueen vastaavien osien kanssa

PRV-sekvenssi alkaa koodausalueensa aminohapon 82 kohdalla, HSV1-sekvenssi aminohapon 80 kohdalla, ja VZV-sekvenssi aminohapon 76 kohdalla. Käytetyt sekvenssit on julkaistu raporteissa, jotka on mainittu kuvan 4 selitysten yhteydessä. Vertailu tehtiin käyttämällä Multalin-tietokoneohjelmaa. Tähdillä on merkitty identtisiä aminohappoja ja kaksoispisteillä analogisia aminohappoja.

Kuva 15: MSVneoGI-plasmidin konstruointi BHV-1:n gI-geenin eukaryoottista ilmentämistä varten

- 5 BHV-1:n gI-geenin osittaisen sekvenssin aminohappovertailun perusteella on arvioitu BHV-1:n gI-geenin oletettu sijaintikohta. Tämän arvioinnin perusteella pääteltiin, että 1,7 kb:n pituinen SmaI-jakso sisältää BHV-1:n gE-geenin täydellisen koodausalueen. Tämän 1,7 kb:n pituisen SmaI-jakson sijainti on merkitty kentässä A. Tämän 1,7 kb:n pituisen SmaI-jakson tylppiin
- 10 päihin on standardinmukaisia menetelmiä käyttäen liitetty BamHI-sitojat. Näin saatu tuote pilkottiin BamHI:lla ja liitettiin eukaryoottiseen ilmentämisvektoriin MSV-neo. MSV-neo-vektorissa on ainoa BamHI-kohta MSV-LTR:n takana, jolla on vahva promoottorivaikutus. Tämä vektori on kuvattu julkaisussa Rijsewijk ym, 1987 EMBO J. 6, 127-131.

15

Kuva 16: BHV-1:n gI/gE-kaksoishäviämäjakson konstruointi

- Glykoproteiinin gE geenin asema ja glykoproteiinin gI geenin oletettu asema BHV-1:n U_S-alueella on esitetty diagrammissa A. Vinoviivoitetut lohkot
- 20 osoittavat U_S-aluetta rajaavia toisintoja. Kentässä B on esitetty fyysinen kartta eräistä oleellisista restriktioentsyymikohdista kummankin geenin sijainnin suhteen. gI/gE-häviämäjakson konstruointiseksi kloonattiin p1,7-SmaI/o, joka sisältää gI-geeniä ympäröivän 1,7 kb:n pituisen SmaI-jakson, pilkotaan PstI:lla. Jäljellä olevan 350 bp:n pituisen SmaI-PstI-liitännäisen PstI-kohdan
- 25 pää tylypistetään käyttäen standardinmukaisia molekyylibiologisia menetelmiä. Myös EcoNISmaI-jakson (ks. Fig. 6B), joka on eristetty kuvan 6A yhteydessä kuvatussa 4,1 kb:n pituisesta HindIII-EcoRI-jaksosta, pää tylypistetään ja liitetään muunnettuun PstI-kohtaan. Tämä on esitetty diagrammeissa C ja D. Näin saadusta kloonista pΔIE voidaan SmaI-DraI-jakso eristää BHV-1:n villin
- 30 tyypin DNA:n kanssa rekombinoimiseksi.

Lyhenteitä: E = EcoRI, H = HindIII, S = SmaI, P = PstI, ENI = EcoNI, D = DraI, kb = kiloemäs, U_S = unique short

Kuva 17: Viruksen nenästä erittymisen keskiarvo vasikoilla rokotuksen jälkeen

- 5 • = Difivac-1:llä rokotettu
 o = rokottamaton verrokki

Kuva 18: Vasikoiden päivittäisen kliinisen arvon keskiarvo BHV-1:n virulentilla kannalla altistamisen jälkeen, merkinnät kuten kuvassa 17.

10

Kuva 19: Vasikoiden peräsuolen lämpötilan keskiarvo BHV-1:n virulentilla kannalla altistamisen jälkeen, merkinnät kuten kuvassa 17.

Kuva 20: Vasikoiden kasvun keskiarvo BHV-1:n virulentilla kannalla altistamisen jälkeen, merkinnät kuten kuvassa 17.

15

Kuva 21: Viruksen nenästäerittymisen keskiarvo vasikoilla BHV-1:n virulentilla kannalla altistamisen jälkeen, merkinnät kuten kuvassa 17.

Kuva 22: Vasikoiden peräsuolen lämpötilan keskiarvo BHV-1:n virulentilla kannalla altistamisen jälkeen

20

- = Lam gE:llä rokotettu
o = Lam gE/TK:lla rokotettu
x = rokottamaton verrokki

25

Kuva 23: Vasikoiden kasvun keskiarvo BHV-1:n virulentilla kannalla altistamisen jälkeen, merkinnät kuten kuvassa 22

Kuva 24: Vasikoiden päivittäisen kliinisen arvon keskiarvo BHV-1:n virulentilla kannalla altistamisen jälkeen, merkinnät kuten kuvassa 22.

30

Taulukko 1: Viruksen nenästäerittyminen vasikoilla Lam gE⁻:llä ja Lam gE⁻/TK⁻:llä rokottamisen ja BHV-1:n virulentilla kannalla altistamisen jälkeen näissä rokotetuissa vasikoissa ja verrokkivasikoissa

Viruksen nenästäerittymisen keskimääräinen kesto päivinä

Ryhmä	Rokotuksen jälkeen	Altistamisen jälkeen
verrokki	0	10,33 ±1,51
Lam gE ⁻	7,00±0,89	4,83±1,17
Lam gE ⁻ /TK ⁻	7,17±1,33	5,17±0,98

Taulukko 2: Monoklonaalisten gE-vasta-aineiden (Mab) tunnusmerkit

Mab	gE-Mab-ehdokkaiden reaktiivisuus seuraavien kanssa:								
	Difi- vac-1 3T3/ EBTR	Lam gE ⁻	Prok.	3T3	gE	3T3 gE Difi- vac-1	3t3 gE/gI	Ag ryhmä	Ab karja
1	-	-	nd	-	+	+	?	I	+
2	-	-	-	+	+	+	+	I	-
3	-	-	+	+	+	+	+	?	-
4	-	-	+	+	+	+	+	?	-
42	-	-	nd	-	-	-	?	V?	±
51	-	-	nd	-	-	?	+	III	+
52	-	-	+	+	+	+	+	?	-
53	-	-	nd	-	+	+	+	III	+
59	-	-	nd	-	-	-	+	III	+
66	-	-	nd	+	+	+	+	III	+
67	-	-	nd	-	+	+	+	III	+
68	-	-	-	+	+	+	+	IV	+
72	-	-	-	+	+	+	+	V	±
75	-	-	nd	-	+	+	?	I	+
78	-	-	nd	-	+	+	?	nd	-
81	-	-	-	+	+	+	+	II?	-

+ : Kaikissa 8 testatussa seerumissa estoprosentti oli > 50 % epäsuorassa IPMA-blocking -testissä.

± : Seerumien estoprosentti oli ± 50 %.

- : Seerumien estoprosentti oli < 50 %.

SEKVENSSILISTAUS

SEQ ID NO:1

PITUUS: 2027 nukleotidia, 575 aminohappoa

5 TYYPPI: nukleotidi ja aminohappo

SÄIKEISYYS: yksinkertainen

10	AGGGCGGAGC GTTGAGCGGC CCGACCGCCG CCGGGTTGTT AAATGGGTCT CGCGCGGCTC	60
	----> deleted in Difivac1	
	GTGGTTCCAC ACCGCCGGAG AACCAGCGCG AGCTTCGCTG CGTGTGTCCC GCGAGCTGCG	120
	AsuII	
15	TTCCGGGGAA CGGCGCACGC GAGAGGGTTC GAAAAGGGCA TTTGGCA	167
	ATG CAA CCC ACC GCG CCG CCC CGG CGG CGG TTG CTG CCG CTG CTG CTG	215
20	Met Gln Pro Thr Ala Pro Pro Arg Arg Arg Leu Leu Pro Leu Leu Leu	
	1 5 10 15	
	----- SIGNAL PEPTIDE -----	
25	CCG CAG TTA TTG CTT TTC GGG CTG ATG GCC GAG GCC AAG CCC GCG ACC	263
	Pro Gln Leu Leu Leu Phe Gly Leu Met Ala Glu Ala Lys Pro Ala Thr	
	20 25 30	
	SmaI	
30	GAA ACC CCG GGC TCG GCT TCG GTC GAC ACG GTC TTC ACG GCG CGC GCT	311
	Glu Thr Pro Gly Ser Ala Ser Val Asp Thr Val Phe Thr Ala Arg Ala	
	35 40 45	
35	GGC GCG CCC GTC TTT CTC CCA GGG CCC GCG GCG CGC CCG GAC GTG CGC	359
	Gly Ala Pro Val Phe Leu Pro Gly Pro Ala Ala Arg Pro Asp Val Arg	
	50 55 60	
40	GCC GTT CGC GGC TGG AGC GTC CTC GCG GGC GCC TGC TCG CCG CCC GTG	407
	Ala Val Arg Gly Trp Ser Val Leu Ala Gly Ala Cys Ser Pro Pro Val	
	65 70 75 80	
45	CCG GAG CCC GTC TGC CTC GAC GAC CGC GAG TGC TTC ACC GAC GTG GCC	455
	Pro Glu Pro Val Cys Leu Asp Asp Arg Glu Cys Phe Thr Asp Val Ala	
	85 90 95	
50	CTG GAC GCG GCC TGC CTG CGA ACC GCC CGC GTG GCC CCG CTG GCC ATC	503
	Leu Asp Ala Ala Cys Leu Arg Thr Ala Arg Val Ala Pro Leu Ala Ile	
	100 105 110	
55	GCG GAG CTC GCC GAG CGG CCC GAC TCA ACG GGC GAC AAA GAG TTT GTT	551
	Ala Glu Leu Ala Glu Arg Pro Asp Ser Thr Gly Asp Lys Glu Phe Val	
	115 120 125	

	PvuII																
	CTC	GCC	GAC	CCG	CAC	GTC	TCG	GCG	CAG	CTG	GGT	CGC	AAC	GCG	ACC	GGG	599
	Leu	Ala	Asp	Pro	His	Val	Ser	Ala	Gln	Leu	Gly	Arg	Asn	Ala	Thr	Gly	
5		130					135					140					
	GTG	CTG	ATC	GCG	GCC	GCA	GCC	GAG	GAG	GAC	GGC	GGC	GTG	TAC	TTC	CTG	647
	Val	Leu	Ile	Ala	Ala	Ala	Ala	Glu	Glu	Asp	Gly	Gly	Val	Tyr	Phe	Leu	
10		145				150					155					160	
	TAC	GAC	CGG	CTC	ATC	GGC	GAC	GCC	GGC	GAC	GAG	GAG	ACG	CAG	TTG	GCG	695
	Tyr	Asp	Arg	Leu	Ile	Gly	Asp	Ala	Gly	Asp	Glu	Glu	Thr	Gln	Leu	Ala	
15					165					170					175		
	CTG	ACG	CTG	CAG	GTC	GCG	ACG	GCC	GGC	GCG	CAG	GGC	GCC	GCG	CGG	GAC	743
	Leu	Thr	Leu	Gln	Val	Ala	Thr	Ala	Gly	Ala	Gln	Gly	Ala	Ala	Arg	Asp	
				180					185					190			
20																	
	GAG	GAG	AGG	GAA	CCA	GCG	ACC	GGG	CCC	ACC	CCC	GGC	CCG	CCG	CCC	CAC	791
	Glu	Glu	Arg	Glu	Pro	Ala	Thr	Gly	Pro	Thr	Pro	Gly	Pro	Pro	Pro	His	
			195					200					205				
25																	
	CGC	ACG	ACG	ACA	CGC	GCG	CCC	CCG	CGG	CGG	CAC	GGC	GCG	CGC	TTC	CGC	839
	Arg	Thr	Thr	Thr	Arg	Ala	Pro	Pro	Arg	Arg	His	Gly	Ala	Arg	Phe	Arg	
		210					215					220					
30											SmaI						
	GTG	CTG	CCG	TAC	CAC	TCC	CAC	GTA	TAC	ACC	CCG	GGC	GAT	TCC	TTT	CTG	887
	Val	Leu	Pro	Tyr	His	Ser	His	Val	Tyr	Thr	Pro	Gly	Asp	Ser	Phe	Leu	
	225					230					235					240	
35																	
	CTA	TCG	GTG	CGT	CTG	CAG	TCT	GAG	TTT	TTC	GAC	GAG	GCT	CCC	TTC	TCG	935
	Leu	Ser	Val	Arg	Leu	Gln	Ser	Glu	Phe	Phe	Asp	Glu	Ala	Pro	Phe	Ser	
					245					250					255		
40																	
	GCC	AGC	ATC	GAC	TGG	TAC	TTC	CTG	CGG	ACG	GCC	GGC	GAC	TGC	GCG	CTC	983
	Ala	Ser	Ile	Asp	Trp	Tyr	Phe	Leu	Arg	Thr	Ala	Gly	Asp	Cys	Ala	Leu	
				260					265					270			
45																	
	ATC	CGC	ATA	TAC	GAG	ACG	TGC	ATC	TTC	CAC	CCC	GAG	GCA	CCG	GCC	TGC	1031
	Ile	Arg	Ile	Tyr	Glu	Thr	Cys	Ile	Phe	His	Pro	Glu	Ala	Pro	Ala	Cys	
			275					280					285				
50																	
	CTG	CAC	CCC	GCC	GAC	GCG	CAG	TGC	AGC	TTC	GCG	TCG	CCG	TAC	CGC	TCC	1079
	Leu	His	Pro	Ala	Asp	Ala	Gln	Cys	Ser	Phe	Ala	Ser	Pro	Tyr	Arg	Ser	
		290					295					300					
55																	
	GAG	ACC	GTG	TAC	AGC	CGG	CTG	TAC	GAG	CAG	TGC	CGC	CCG	GAC	CCT	GCC	1127
	Glu	Thr	Val	Tyr	Ser	Arg	Leu	Tyr	Glu	Gln	Cys	Arg	Pro	Asp	Pro	Ala	
	305					310					315					320	

5	GGT CGC TGG CCG CAC GAG TGC GAG GGC GCC GCG TAC GCG GCG CCC GTT Gly Arg Trp Pro His Glu Cys Glu Gly Ala Ala Tyr Ala Ala Pro Val 325 330 335	1175
10	GCG CAC CTG CGT CCC GCC AAT AAC AGC GTA GAC CTG GTC TTT GAC GAC Ala His Leu Arg Pro Ala <u>Asn Asn Ser</u> Val Asp Leu Val Phe Asp Asp 340 345 350	1223
15	GCG CCG GCT GCG GCC TCC GGG CTT TAC GTC TTT GTG CTG CAG TAC AAC Ala Pro Ala Ala Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Asn 355 360 365	1271
20	<u>HindIII</u> GGC CAC GTG <u>GAA GCT</u> TGG GAC TAC AGC CTA GTC GTT ACT TCG GAC CGT Gly His Val Glu Ala Trp Asp Tyr Ser Leu Val Val Thr Ser Asp Arg 370 375 380	1319
25	TTG GTG CGC GCG GTC ACC GAC CAC ACG CGC CCC GAG GCC GCA GCC GCC Leu Val Arg Ala Val Thr Asp His Thr Arg Pro Glu Ala Ala Ala Ala 385 390 395 400	1367
30	GAC GCT CCC GAG CCA GGC CCA CCG CTC ACC AGC GAG CCG GCG GGC GCG Asp Ala Pro Glu Pro Gly Pro Pro Leu Thr Ser Glu Pro Ala Gly Ala 405 410 415	1415
35	CCC ACC GGG CCC GCG CCC TGG CTT GTG GTG CTG GTG GGC GCG CTT GGA Pro Thr Gly Pro Ala Pro Trp Leu Val Val Leu Val Gly Ala Leu Gly 420 425 430	1463
40	----- TRANSMEMBRANE HELIX ----- CTC GCG GGA CTG GTG GGC ATC GCA GCC CTC GCC GTT CGG GTG TGC GCG Leu Ala Gly Leu Val Gly Ile Ala Ala Leu Ala Val Arg Val Cys Ala 435 440 445	1511
45	CGC CGC GCA AGC CAG AAG CGC ACC TAC GAC ATC CTC AAC CCC TTC GGG Arg Arg Ala Ser Gln Lys Arg Thr Tyr Asp Ile Leu Asn Pro Phe Gly 450 455 460	1559
50	CCC GTA TAC ACC AGC TTG CCG ACC AAC GAG CCG CTC GAC GTG GTG GTG Pro Val Tyr Thr Ser Leu Pro Thr Asn Glu Pro Leu Asp Val Val Val 465 470 475 480	1607
55	CCA GTT AGC GAC GAC GAA TTT TCC CTC GAC GAA GAC TCT TTT GCG GAT Pro Val Ser Asp Asp Glu Phe Ser Leu Asp Glu Asp Ser Phe Ala Asp 485 490 495	1655

	GAC GAC AGC GAC GAT GAC GGG CCC GCT AGC AAC CCC CCT GCG GAT GCC	1703
	Asp Asp Ser Asp Asp Asp Gly Pro Ala Ser Asn Pro Pro Ala Asp Ala	
	500 505 510	
5	TAC GAC CTC GCC GGC GCC CCA GAG CCA ACT AGC GGG TTT GCG CGA GCC	1751
	Tyr Asp Leu Ala Gly Ala Pro Glu Pro Thr Ser Gly Phe Ala Arg Ala	
	515 520 525	
10	CCC GCC AAC GGC ACG CGC TCG AGT CGC TCT GGG TTC AAA GTT TGG TTT	1799
	Pro Ala <u>Asn Gly Thr</u> Arg Ser Ser Arg Ser Gly Phe Lys Val Trp Phe	
	530 535 540	
15	AGG GAC CCG CTT GAA GAC GAT GCC GCG CCA GCG CGG ACC CCG GCC GCA	1847
	Arg Asp Pro Leu Glu Asp Asp Ala Ala Pro Ala Arg Thr Pro Ala Ala	
	545 550 555 560	
20	CCA GAT TAC ACC GTG GTA GCA GCG CGA CTC AAG TCC ATC <u>CTC CGC TAG</u>	1895
	Pro Asp Tyr Thr Val Val Ala Ala Arg Leu Lys Ser Ile Leu Arg *	
	565 570 575	
25	GC GCCCCCCC CCCCCGCGC GCTGTGCCGT CTGACGGAAA GCACCCGCGT GTAGGGCTGC	1955
	ATATAAATGG AGCGCTCACA CAAAGCCTCG TCGGCTGCT TCGAAGGCAT GGAGAGTCCA	2015
	CGCAGCGTCG TC	2027
30	SEQ ID NO:2	
	PITUUS: 20 nukleotidia	
	TYYPPI: nukleotidi	
	SÄIKEISYYS: yksinkertainen	
35	ACGTGGTGGT GCCAGTTAGC	20
	SEQ ID NO:3	
	PITUUS: 22 nukleotidia	
	TYYPPI: nukleotidi	
40	SÄIKEISYYS: yksinkertainen	
	ACCAAAC TTT GAACCCAGAG CG	22

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä rokotekoostumuksen saamiseksi eläinten, erityisesti nisäkkäiden, tarkemmin nautaeläinten rokottamiseksi niiden suojaamiseksi
5 BHV-1-virusta vastaan, jolloin rokotekoostumus muodostetaan BHV-1-mutantista ja sopivasta kantajasta tai apuaineesta, jolloin mainitussa BHV-1-mutantissa on häviämä glykoproteiinin gE geenissä, joka gE on proteiini, jolla erityisessä BHV-1-kannassa on kuvan 3A mukainen aminohapposekvenssi ja joka voidaan erottaa serologisesti villiä tyyppiä olevasta BHV-1:stä.
- 10 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jolloin mainittu häviämä gE-geenissä on aiheutettu heikennysmenetelmällä pikemminkin kuin konstruoitu DNA-rekombinaatiomenetelmillä.
- 15 3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, jolloin saatu mutantti on Difivac-1 (Institut Pasteur France, tallennusnumero I-1213).
4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jolloin mainittu häviämä on konstruoitu DNA-rekombinaatiomenetelmillä.
- 20 5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jolloin mutantissa on mainitun glykoproteiinin gE geenin häviämän lisäksi häviämä glykoproteiinin gI geenissä.
- 25 6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jolloin mainittu mutantti valitaan prosessissa, jossa erotetaan BHV-1-virukset, joissa on koskematon gE geeni, ja BHV-1-virukset, joissa on häviämä gE geenissä, jolloin mainittu prosessi käsittää vaiheen, jossa tutkitaan, reagoiko viruksen aminohappo gE:lle spesifisten koettimien tai alukkeiden kanssa, jotka on saatu
30 glykoproteiinia gE koodaavista nukleotidisekvensseistä.
7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jolloin mainittu mutantti valitaan prosessissa, jossa erotetaan BHV-1-virukset, jotka ilmentävät glykoproteiinia gE, ja BHV-1-virukset, joissa on häviämä glykoproteiinin gE
35 geenissä, jolloin mainittu prosessi käsittää vaiheen, jossa tutkitaan, reagoiko virus gE:lle spesifisten vasta-aineiden kanssa, jotka on muodostettu gE:tä tai gE:n aminohapposekvenssistä saatuja peptidejä vastaan.

Patentkrav:

1. Förfarande för att åstadkomma en vaccinsammansättning för vaccinering av djur, särskilt däggdjur, noggrannare sagt nötdjur, för att skydda dem mot
5 BHV-1-virus, varvid vaccinsammansättningen bildas av BHV-1-mutant och en lämplig bärare eller hjälpmedel, varvid sagda BHV-1-mutant uppvisar en deletion i genen för glykoprotein gE, vilken gE är ett protein som hos en särskilt BHV-1-stam uppvisar en aminosyrasekvens enligt Fig. 3A och som kan separeras serologiskt från BHV-1 av vild typ.
10
2. Förfarande enligt kravet 1, varvid sagda deletion i genen gE är förorsakad genom ett försvagningsförfande snarare än konstruerad med DNA-rekombinationsförfaranden.
- 15 3. Förfarande enligt kravet 2, varvid den uppnådda mutanten är Difivac-1 (Institut Pasteur France, deponeringsnummer I-1213).
4. Förfarande enligt kravet 1, varvid sagda deletion är konstruerad medelst DNA-rekombinationsförfaranden.
20
5. Förfarande enligt krav 1, varvid mutanten uppvisar, utöver sagda deletion i genen för glykoprotein gE, en deletion i genen för glykoprotein gI.
6. Förfarande enligt krav 1, varvid sagda mutant väljs i en process, där BHV-
25 1-virus med en orörd gen gE, och BHV-1-virus med deletion i genen gE separeras, varvid sagda process omfattar en fas, där det granskas om aminosyra av viruset reagerar med gE-specifika prober eller primer, som är erhållna från glykoproteinet gE kodande nukleotidsekvenser.
- 30 7. Förfarande enligt krav 1, varvid sagda mutant väljs i en process där BHV-1-virus som uttrycker glykoprotein gE, och BHV-1-virus med deletion i genen gE separeras, varvid sagda process omfattar en fas där det granskas om viruset reagerar med gE-specifika antikroppar, som är bildade mot gE eller peptider, som är erhållna från aminosyrasekvenser av gE.

110060

1/30

H P
D I D I

8,4 kb = — — — — — 6 kb
7,2 kb = — — — — —

— —

1 2 3 4

FIG.1A

070296 3304

HindIII K - jakso

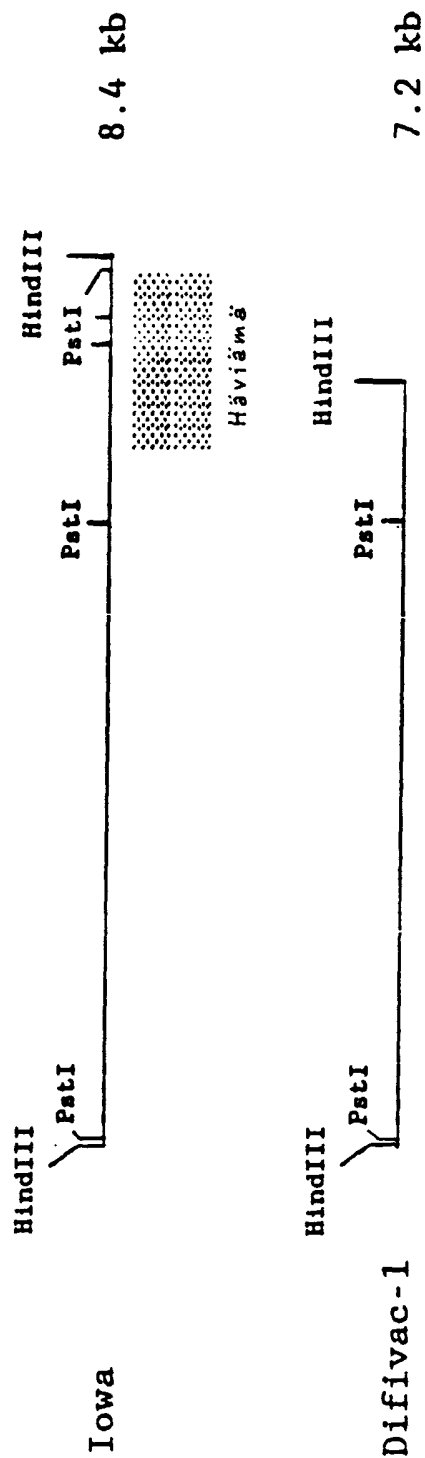


FIG.1B

FIG. 2

```

AGGGCGGAGC GTTGAGCGGC CCGACCGCCG CCGGGTTGTT AAATGGGTCT CGCGCGGCTC 60
      |-----> häviämä Difivac - 1:53
GTGGTTCCAC ACCGCCGGAG AACCAGCGCG AGCTTCGCTG CGTGTGTCCC GCGAGCTGCG 120

TTCCGGGGAA CGGCGCACGC GAGAGGGTTC GAAAAGGGCA TTTGGCA 167
      AsuII

ATG CAA CCC ACC GCG CCG CCC CGG CGG TTG CTG CCG CTG CTG CTG CTG 215
Met Gln Pro Thr Ala Pro Pro Arg Arg Arg Leu Leu Pro Leu Leu Leu
1 5 10 15
===== SIGNAL(PEPTID) =====

CCG CAG TTA TTG CTT TTC GSG CTG ATG GCC GAG GCC AAG CCC GCG ACC 263
Pro Gln Leu Leu Phe Phe Gly Leu Met Ala Glu Ala Lys Pro Ala Thr
20 25 30
=====

GAA ACC CCG GGC TCG GCT TCG GTC GAC ACG GTC TTC ACG GCG GCT 311
Glu Thr Pro Gly Ser Ala Ser Val Asp Thr Val Phe Thr Ala Arg Ala
35 40 45
      SmaI

GGC GCG CCC GTC TTT CTC CCA GGG CCC GCG GCG GCG CCG GAC GTG CGC 359
Gly Ala Pro Val Phe Leu Pro Gly Pro Ala Ala Arg Pro Asp Val Arg
50 55 60

GCC GTT CGC GGC TGG AGC GTC CTC GCG GGC GCC TGC TCG CCG CCC GTG 407
Ala Val Arg Gly Trp Ser Val Leu Ala Gly Ala Cys Ser Pro Pro Val
65 70 75 80

```

FIG. 3A

CCG GAG CCC GTC TGC CTC GAC GAC CGC GAG TGC TTC ACC GAC GTG GCC 455
 Pro Glu Pro Val Cys 85 Leu Asp Asp Arg Glu 90 Cys Phe Thr Asp Val Ala 95

 CTG GAC GCG GCC TGC CTG CGA ACC GCC CGC GCG GTG GCC CTG GCC ATC 503
 Leu Asp Ala Ala Cys 100 Leu Arg Thr Ala Arg Val Ala Pro Leu Ala Ile 110

 GCG GAG CTC GCC GAG CGG CCC GAC TCA ACG GGC GAC AAA GAG TTT GTT 551
 Ala Glu Leu Ala Glu Arg Pro Asp Ser Thr Gly Asp Lys Glu Phe Val 115 120 125

 CTC GCC GAC CCG CAC GTC TCG GCG CAG CTG GGT CGC AAC GCG ACC GGG 599
 Leu Ala Asp Pro His Val Ser Ala Gln Leu Gly Arg Asn Ala Thr Gly 130 135 140
 PvuII

 GTG CTG ATC GCG GCC GCA GCC GAG GAG GAC GGC GGC GTG TAC TTC CTG 647
 Val Leu Ile Ala Ala 150 Glu Ala Glu Asp Gly 155 Gly Val Tyr Phe Leu 160

 TAC GAC CGG CTC ATC GGC GAC GCC GGC GAG GAG GAG GAG AC GCG TTG GCG 695
 Tyr Asp Arg Leu 165 Ile Gly Asp Ala Gly 170 Asp Glu Thr Gln Leu Ala 175

 CTG ACG CTG CAG GTC GCG ACG GCC GGC CAG GGC GCC GCG CGG GAC 743
 Leu Thr Leu Gln Val Ala Thr Ala Gly Ala Gln Gly Ala Ala Arg Asp 180 185 190

FIG. 3A

GAG GAG AGG GAA CCA GCG ACC GGG CCC ACC CCC GGC CCG CCG CCC CAC 791
 Glu Glu Arg Glu Pro Ala Thr Gly Pro Thr Pro Gly Pro Pro Pro His
 195 200 205

 CGC ACG ACG ACA CGC GCG CCC CCG CCG CCG CAC GGC GCG CCG TTC CGC 839
 Arg Thr Thr Thr Arg Ala Pro Pro Arg Arg His Gly Ala Arg Phe Arg
 210 215 220

 GTG CTG CCG TAC CAC TCC CAC GTA TAC ACC CCG GGC GAT TCC TTT CTG 887
 Val Leu Pro Tyr His Ser His Val Tyr Thr Pro Gly Asp Ser Phe Leu
 225 230 235
 SmaI
 CTA TCG GTG CGT CTG CAG TCT GAG TTT TTC GAC GAG GCT CCC TTC TCG 935
 Leu Ser Val Arg Leu Gln Ser Glu Phe Phe Asp Glu Ala Pro Phe Ser
 245 250 255

 GCC AGC ATC GAC TGG TAC TTC CTG CCG ACG GCC GGC GAC TGC GCG CTC 983
 Ala Ser Ile Asp Trp Tyr Phe Leu Arg Thr Ala Gly Asp Cys Ala Leu
 260 265 270

 ATC CGC ATA TAC GAG ACG TGC ATC TTC CAC CCC GAG GCA CCG GCC TGC 1031
 Ile Arg Ile Tyr Glu Thr Cys Ile Phe His Pro Glu Ala Pro Ala Cys
 275 280 285

 CTG CAC CCC GCC GAC GCG CAG TGC AGC TTC GCG TCG CCG TAC CGC TCC 1079
 Leu His Pro Ala Asp Ala Gln Cys Ser Phe Ala Ser Pro Tyr Arg Ser
 290 295 300

FIG. 3A

GAG ACC GTG TAC AGC CGG CTG TAC GAG CAG TGC CGC CCG GAC CCT GCC 1127
 Glu Thr Val Tyr Ser Arg Leu Tyr Glu Gln Cys Arg Pro Asp Pro Ala 320
 305 310 315

GGT CGC TGG CCG CAC GAG TGC GAG GGC GCC GCG TAC GCG GCG CCC GTT 1175
 Gly Arg Trp Pro His Glu Cys Glu Gly Ala Tyr Ala Pro Val 335
 325 330

GCG CAC CTG CGT CCC GCC AAT AAC AGC GTA GAC CTG GTC TTT GAC GAC 1223
 Ala His Leu Arg Pro Ala Asn Asn Ser Val Asp Leu Val Phe Asp Asp 350
 340 345

GCG CCG GCT GCG GCC TCC GGG CTT TAC GTC TTT GTG CTG CAG TAC AAC 1271
 Ala Pro Ala Ala Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Asn 365
 355 360

HindIII
 GGC CAC GTG GAA GCT TGG GAC TAC AGC CTA GTC GTC ACT TCG GAC CGT 1319
 Gly His Val Glu Ala Trp Asp Tyr Ser Leu Val Val Thr Ser Asp Arg 380
 370 375

TTG GTG CGC GCG GTC ACC GAC CAC ACG CGC CCC GAG GCC GCA GCC GCC 1367
 Leu Val Arg Ala Val Thr Asp His Thr Arg Pro Glu Ala Ala Ala 400
 385 390

GAC GCT CCC GAG CCA GGC CCA CCG CTC ACC AGC GAG CCG GCG GGC GCG 1415
 Asp Ala Pro Glu Pro Gly Pro Pro Leu Thr Ser Glu Pro Ala Gly Ala 415
 405 410

FIG. 3A

```

CCC ACC GGG CCC GCG CCC TGG CTT GTG GTG GGC GCG CTT GGA      1463
Pro Thr Gly Pro Ala Pro Trp Leu Val Val Leu Val Gly Ala Leu Gly
420                      425                      430
===== MEMBRAANIN LÄPÄISEVÄ KIERUKKA =====
CTC GCG GGA CTG GTG GGC ATC GCA GCC CTC GCC GTT CGG GTG TGC GCG      1511
Leu Ala Gly Leu Val Gly Ile Ala Ala Leu Ala Val Arg Val Cys Ala
435                      440                      445
=====
CGC CGC GCA AGC CAG AAG CGC ACC TAC GAC ATC CTC AAC CCC TTC GGG      1559
Arg Arg Ala Ser Gln Lys Arg Thr Tyr Asp Ile Leu Asn Pro Phe Gly
450                      455                      460
=====
CCC GTA TAC ACC AGC TTG CCG ACC AAC GAG CCG CTC GAC GTG GTG GTG      1607
Pro Val Tyr Thr Ser Leu Pro Thr Asn Glu Pro Leu Asp Val Val Val
465                      470                      475                      480
CCA GTT AGC GAC GAC GAA TTT TCC CTC GAC GAA GAC TCT TTT GCG GAT      1655
Pro Val Ser Asp Asp Glu Phe Ser Leu Asp Glu Asp Ser Phe Ala Asp
485                      490                      495
GAC GAC AGC GAC GAT GAC GGC CCC GCT AGC AAC CCC CCT GCG GAT GCC      1703
Asp Asp Ser Asp Asp Gly Pro Ala Ser Asn Pro Pro Ala Asp Ala
500                      505                      510

```

FIG. 3A

TAC GAC CTC GCC GGC GCC CCA GAG CCA ACT AGC GGG TTT GCG CGA GCC 1751
 Tyr Asp Leu Ala Gly Ala Pro Glu Pro Thr Ser Gly Phe Ala Arg Ala
 515 520 525
 CCC GCC AAC GGC ACG CGC TCG AGT CGC TCT GGG TTC AAA GTT TGG TTT 1799
 Pro Ala Asn Gly Thr Arg Ser Ser Arg Ser Gly Phe Lys Val Trp Phe
 530 535 540
 AGG GAC CCG CTT GAA GAC GAT GCC GCG CCA CCG ACC CCG GCC GCA 1847
 Arg Asp Pro Leu Glu Asp Asp Ala Ala Pro Ala Arg Thr Pro Ala Ala
 545 550 555 560
 CCA GAT TAC ACC GTG GTA GCA GCG CGA CTC AAG TCC ATC CTC CGC TAG 1895
 Pro Asp Tyr Thr Val Val Ala Ala Arg Leu Lys Ser Ile Leu Arg *
 565 570 575
 GCGCCCCCCC CCCCCCGCGC GCTGTGCCGT CTGACGGAAA GCACCCGCGT GTAGGCTGC 1955
 ATATAAATGG AGCGCTCACA CAAAGCCTCG TCGGGCTGCT TCGAAGGCAT GGAGAGTCCA 2015
 CGCAGCGTCG TC 2027

ECONI

FIG. 3A

BHV-1 gE



575 aminohappoa

sp = signaaliptidi 26 tähdettä

• = oletettu N-glykosylaatiokohta

tm = membraanin läpäisevä kierukka täkreet 423-450

FIG.3B

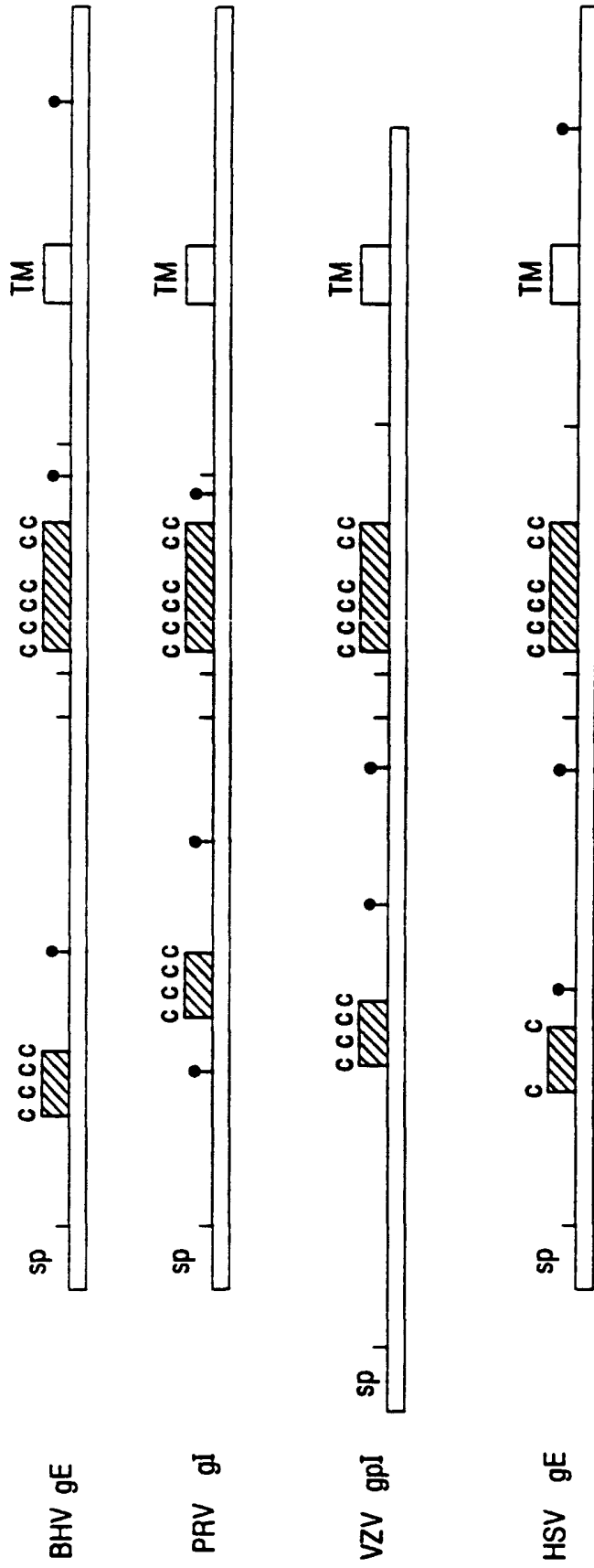


FIG.4A

```

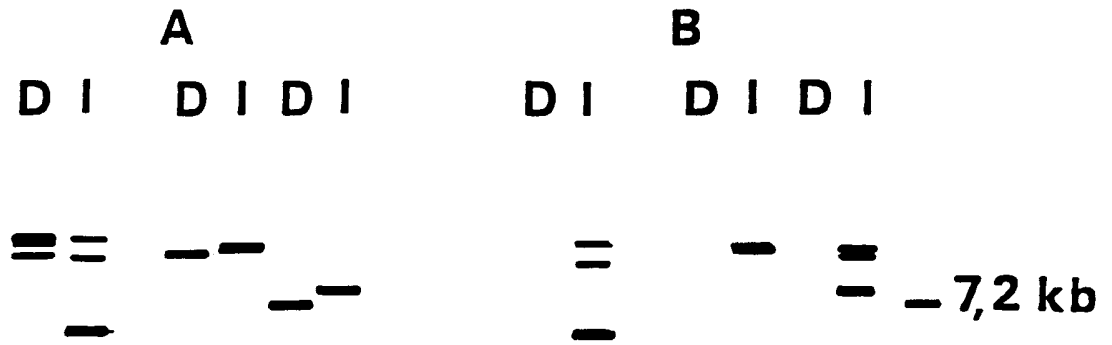
symbol comparison table :   DAYHOFF.DAT; gap penalty : 8
1      10      20      30      40      50      60
PRV  HSQLESPGDTFDLMPRVVSDMGDSRENTFTATLDWYARAPPRCLLYVYVEPCIYHPRAP
    **:*** ** * : : * * * : * * * : * * * *
VZV  HSHVESVGDTFSLAMHLQYKI.H..EAPFDLLLEWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAP
    ***: ** * * : : *** : : * : * * : * * *
BHV  HSHVYTPGDSELLSVRLQSEFFD..EAPESASIDWYFLRTAGDCALIRIYETCIFIHPEAP
    : : ** : * * : : * : * : * : * * : * : *
HSV  EALFSPGETESTNVSIHAIAND..DQTYSMDVVWLRFEDVPTSCAEMRIYESCLYHPQLP
1      10      20      30      40      50

70      80      90      100      110
PRV  ECLRPVDPACSETSPARAALVARRAYASCSPLLGDRWLTACPFDAFGEEVH.....
    : * : : * * * * * * * * * * *
VZV  QCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNC..EHADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGT
    * * : * * * * : * * : * : * : * * *
BHV  ACLHPADAQCTEASPYRSETVYSRLYEQCRRDPAGRWPHCEGEAAYAAPVAHLRPANNSV
    * * * * * * : : * * * * * * * * *
HSV  ECLSPADAPC..AASTWTSRLAVRSYAGCSRTNP...PPRCSAEAHMEPVPLAWQAASV
60      70      80      90      100      110

120      130      140
PRV  ...TNATADESGLYVLVMTNTHNGHVATWDYTLVAT
    : * * * * : * * * * * : * *
VZV  TLKFVDTPESLSGLYVFYVFNHGHVEAVAYTVVST
    * * * * * * * : * * * * * * : * *
BHV  DLVFDDAPAAASGLYVFLQYNGHVEAWDYSLVVT
    : * * * * * * : * * * * * : *
HSV  NLEFRDASPQHSGLYLCVVYVNDHIHAWGHITIST
120      130      140      148

```

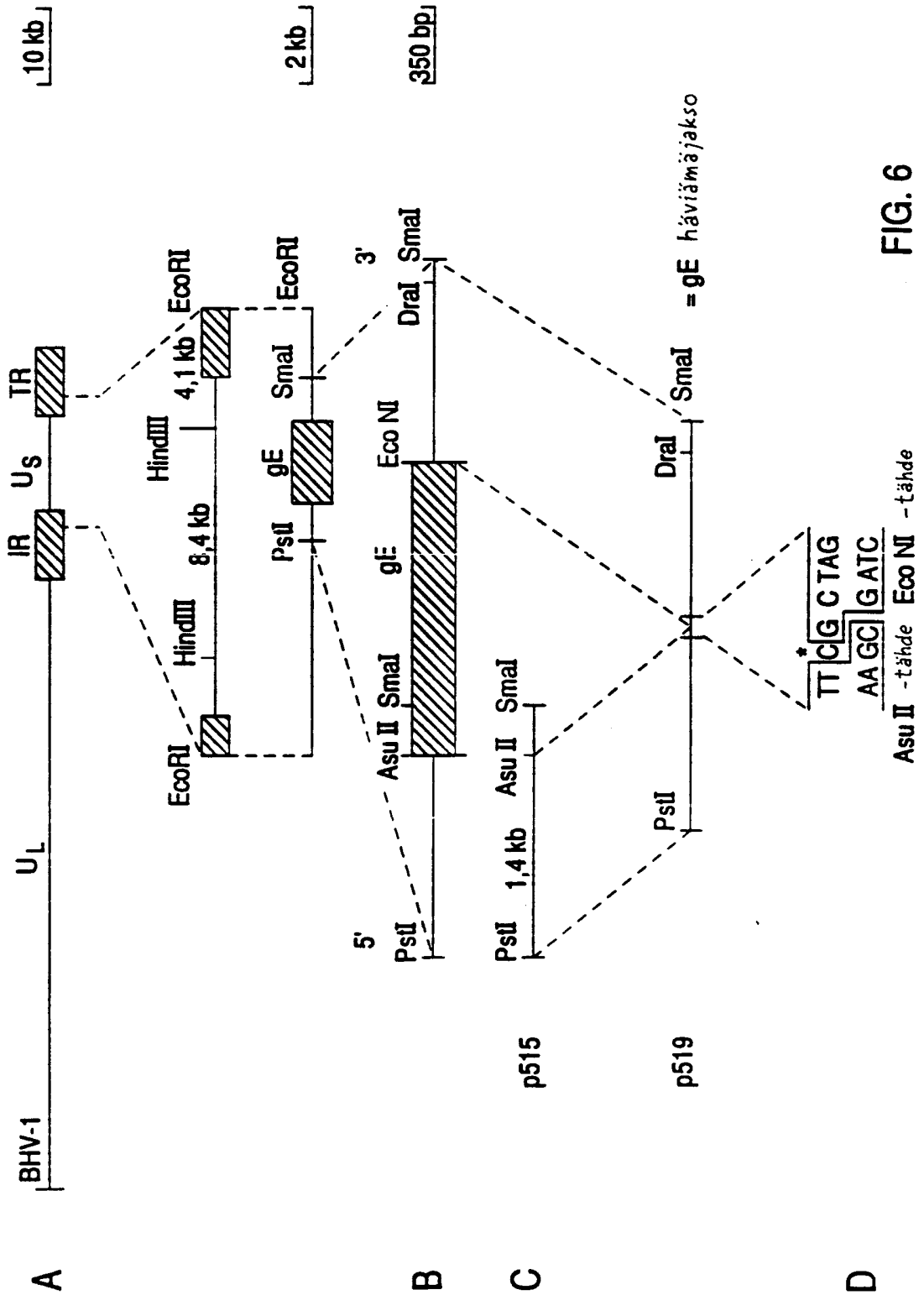
FIG.4B



1 2 3 4 5 6

1 2 3 4 5 6

FIG.5



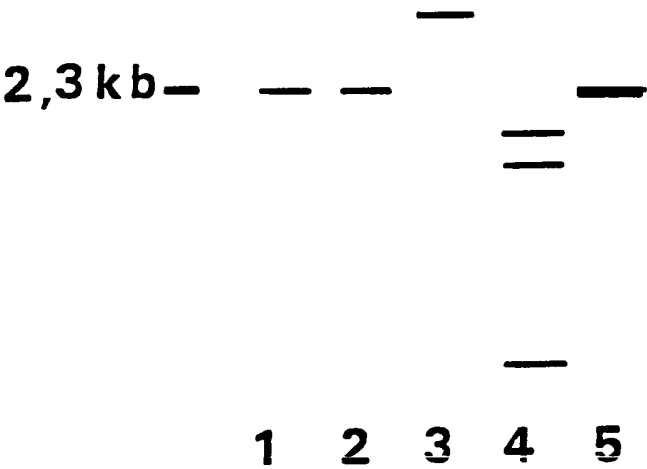


FIG.7A

5
5
5
5
5

5
5
5
5
5

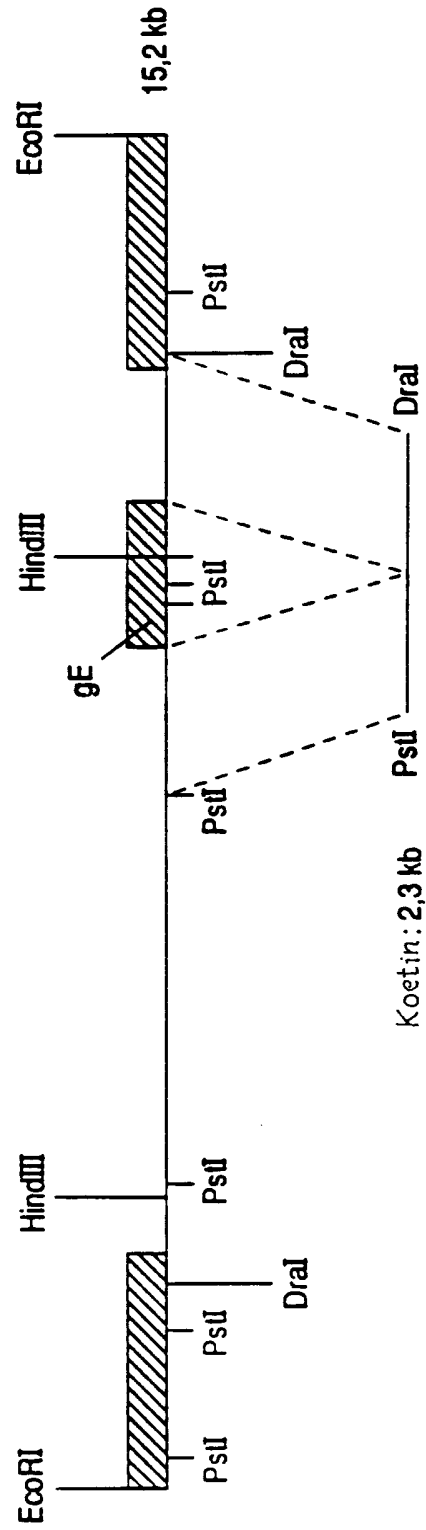


FIG. 7B

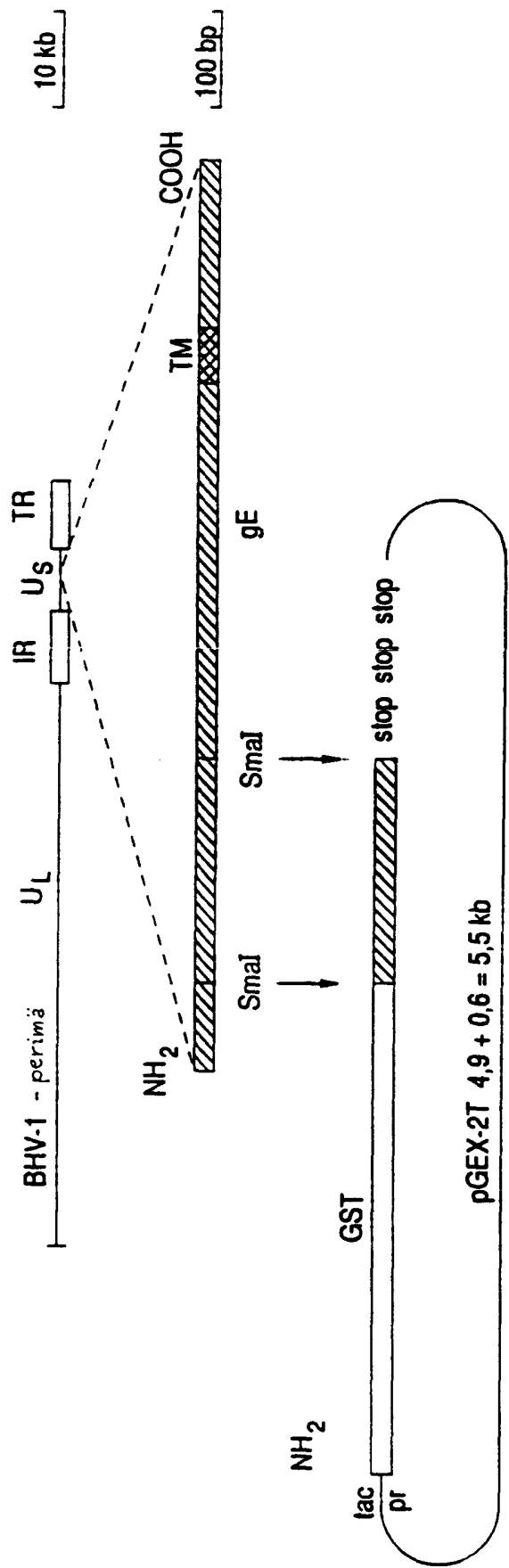


FIG. 8A

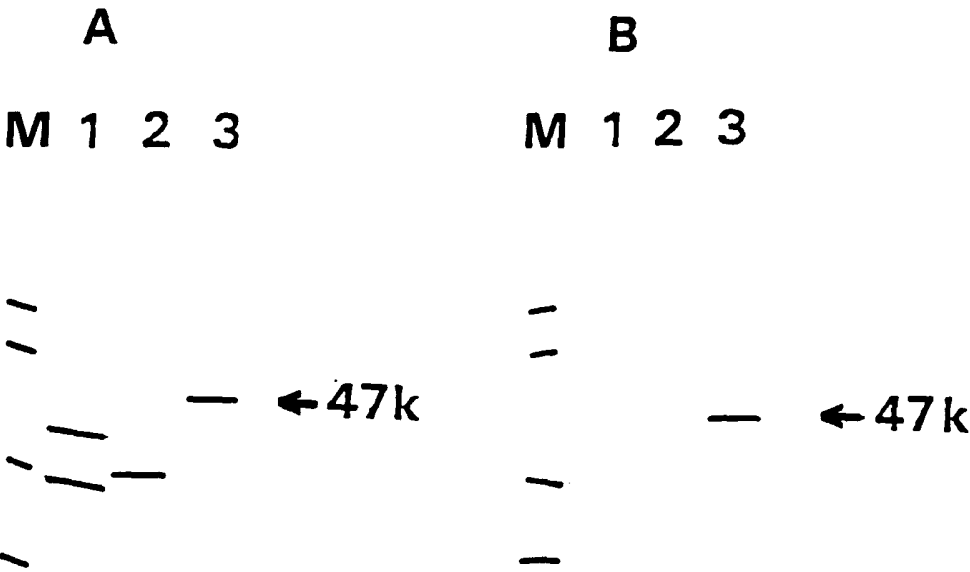


FIG.8B

110060


```

1272      GGCCACGTGGAAGCTTGGGACTACAGCCTAGTCGTACTTCGGACCGTTTGGTGCGCGGGTCACC
             HindIII
GACCACACGCGCCCGAGCGCGCAGCCGCGACGCTCCCGAGCCAGGCCACCGCTACCAAGCAGCGCGGGGCGCG
CCACCGGGCCCGCCCTGGCTTGTGGTGCTGGTGGCGCGCTTGACTCGCGGGACTGGTGGGCATCGCAGCCCTC
GCCGTTCCGGGTGTGCGCGCGCGCAAGCCAGAAGCGCACCTACGACATCCTCAACCCCTTCGGGCCCGTATACACC
AGCTTGCCGACCAACGAGCCGCTCGACGTGGTGGTGCCAGTTAGCGACGACGAAATTTCCCTCGACGAAGACTCTTTT
             P3
GCGGATGACGACAGCGACGATGACGGGGCCCGCTAGCAACCCCTGCGGATGCCCTACGACCTCGCCGGCGCCAGAG
             TaqI
CCAAC TAGCGGGTTTGC GCGAGCCCCCGCCAACGGCACGCGCTCGAGTGGCTCTGGGTTCAABGTTTGGTTAGGGAC
             TaqI
CCGCTTGAAGACGATGCCCGCGCCAGCGCGGACCCCGCGCACCAAGATTACACCGTGGTAGCAGCGGACTCAAGTCC
             P4
ATCCTCCGCTAGGCGCCCCCCCCCGCGCGCTGTGCCGTCTGACGGAAGCACCCGCGTAGGGCTGCATATAA
             EcoNI
ATGGAGCGCTCACACAAAGCCTCGTGGGCTGCTTCGAAGGCATGGAGAGTCCACGCAGCGTCGTC      2027

```

FIG.10

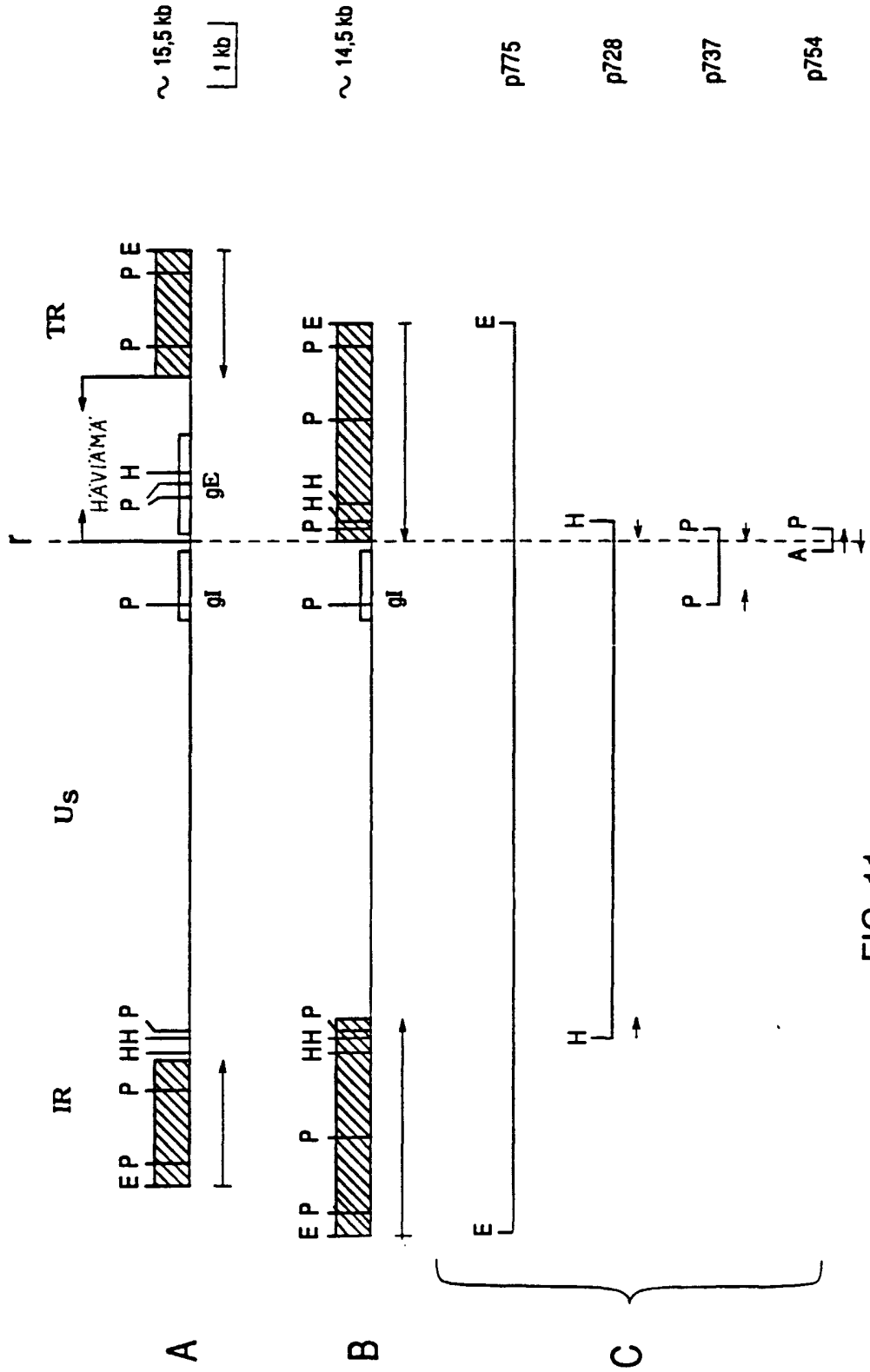


FIG. 11

A

```

-----> gE PROMOOTTORIALUE ----->
5' GAGCGGCCCCGACCGCCGCGGGTTGTTAAATGGGTCTCGCGGGCTCGTGGTTCCACACCGCCGGAGAA
      r
----->|<----- KÄÄNNETTY TOISINTO <-----
CCAGCGC|TGCGAGGGGGGGCTTGGTGGCTGGCGACTCTTTAAGGCGTGCCGCCACGAGCAAGAAGACGGC
      |
<----- KÄÄNNETTY TOISINTO <-----
CTGTATGCTATGCTCCCGCCGACTATTTTCGGTGGTGCCCTCGTCCAAGCCCCTGCTGGTGAAAGTT 3'

```

B(I)

	Unique short	r	käännetty toisinto
Vastakkainen toisintoraja	: GGCACCGGTCCCGGA		TGCGAGGGGGGGCTTGG
(käännetty sekvenssi)	* *		*****
Rekombinoitu alue	: CCGGAGAACCAGCGC		TGCGAGGGGGGGCTTGG

B(II)

		r	
Rekombinoitu alue	: CCGGAGAACCAGCGC		TGCGAGGGGGGGCTTGG
	*****		* * * *
Villin tyypin gE-alue	: CCGGAGAACCAGCGC		GAGCTTCGCTGCGTGTG
			gE -johtaja --->

FIG.12

10 20 30 40 50 60
CTACCACGCCGCGGGCGACTGCTTCGTTATGCTGCAGACGACCGCGTTCGCCTCCTGCCC
Y H A A G A C F V M L Q T T A F A S C P

70 80 90 100 110 120
GCGCGTCGCGAACGACGCCTTTCGCTCCTGCCTGCACGCCGACACGCGCCCCGCTCGCAG
R V A N D A F R S C L H A D T R P A R S

130 140 150 160 170 180
CGAGCGGCGCGGAGCGCCGCGGTGAAAACCGTGCTCTTCTCCATCGCCCATCCGCG
E R R A S A A V E N H V L F S I A H P R

190 200 210 220 230 240
CCCAATAGACTCAGGGCTCTACTTTCTGCGCGTCGGCATCTACGGCGGCACCGCGGGCAG
P I D S G L Y F L R V G I Y G G T A G S

250 260 270 280
CGAGCGCCGCGGAGACGTCTTCCCTTGGCCGCGTTTGTACACA
E R R R D V F P L A A F V H

FIG. 13

symbol comparison table : DAYHOFF.DAT; gap penalty : 8

	1	10	20	30	40	50
BHVI	YHAAGD.CFVMLQTTAFASCPRVAN.AFRSCLHADTRP.ARSERRASAAVENHVLFSIA					
	*	:	****	: *** **:	:	***** : *:
PRV	RLDPKRA.CYTREYAAEYDLCPRVHHEAFRGCLR...KR.EPLARRASAAVEARRLLFVS					
	:	*	***	** *	:	*
HSV1	YPMGHK.CPRVVHVVTVTACPRRPAVAFALCRATDSTH.SPAYPTLELNLAQQPLLVRVQ					
	*	*	*	*:*	***	** ** *
VZV	YADTVAFCFRSVQVIRYDGCPRIRTSAFISCRYKHSWHYGNSTDRISTEPDAGVMLKIT					
	1	10	20	30	40	50

	60	70	80	90	93
BHVI	HPRPIDSGLYFLRVGIYGG.TACSERRRDVFFLAAFVH				
	:*	*	*	*	*
PRV	RPAPPDAGSYVLRVR..NG.TTDLEVLTLVPPRGRPHU				
	*	**	*****:	:	****
HSV1	RATRDYAGVYVLRVWVGDAFNASLFVLGMAIAAEG				
	:	:	*****	*:	***:
VZV	KPGINDAGVYVLLVRLDHSRSTDGFI LGVNVYTAG				
		70	80	90	94

FIG. 14

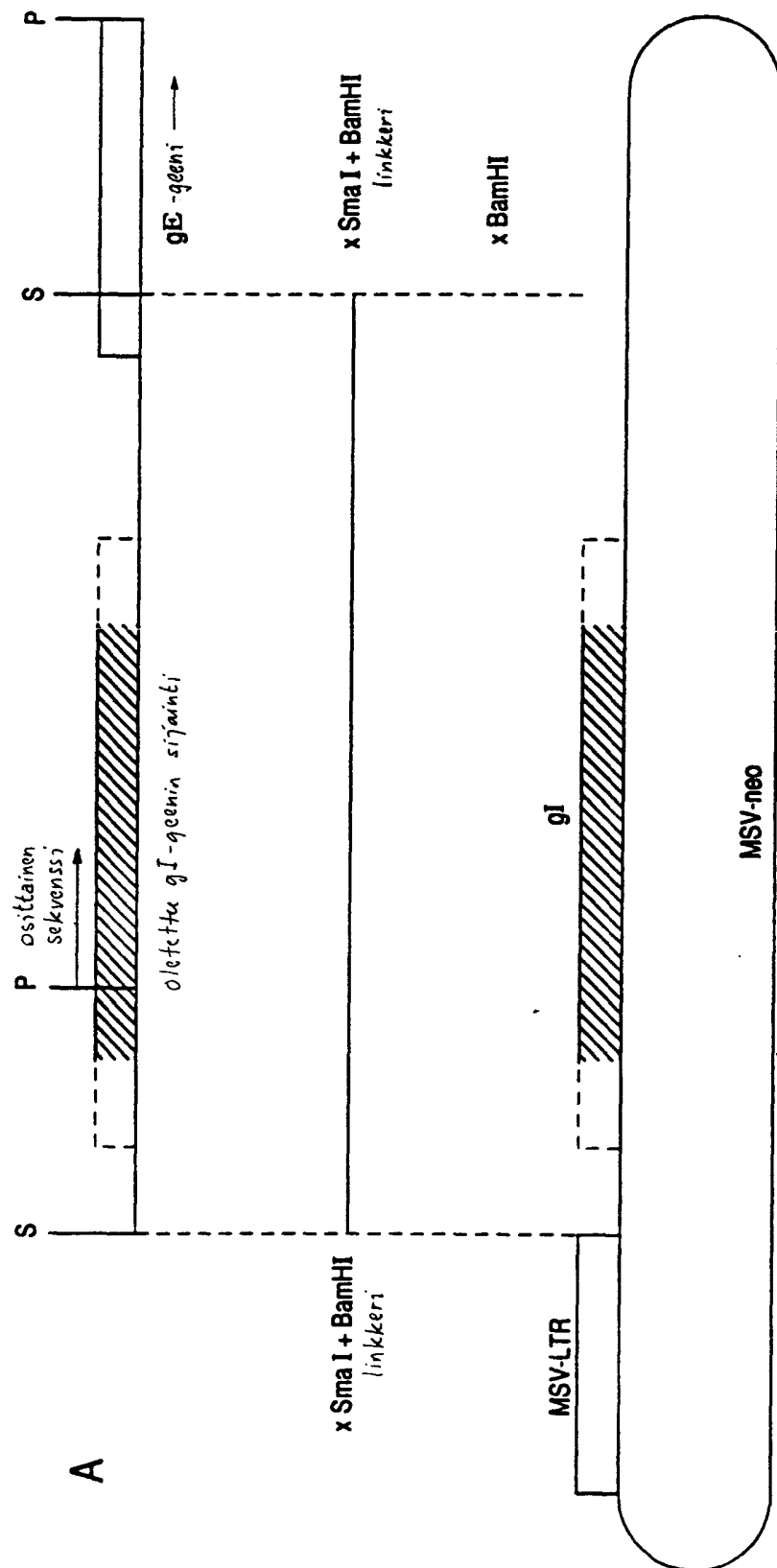


FIG. 15

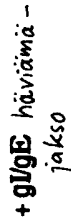


FIG. 16

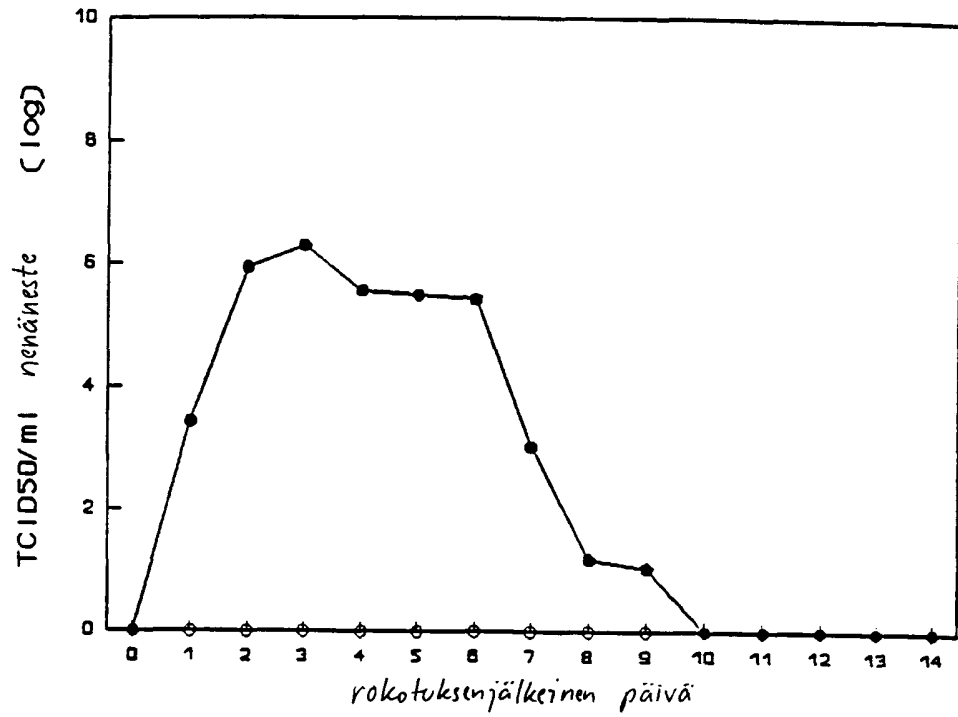


FIG.17

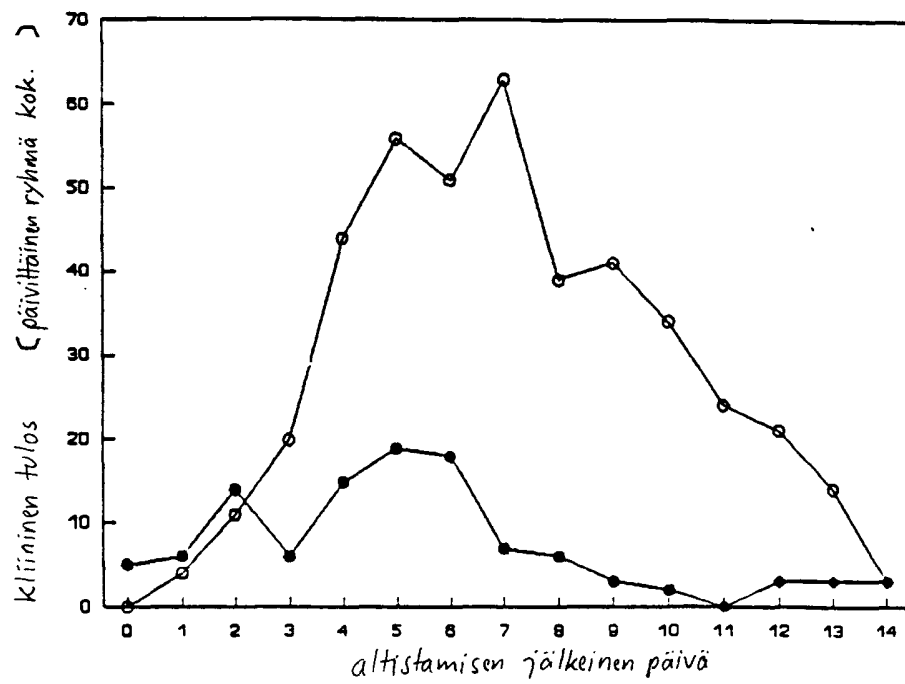


FIG.18

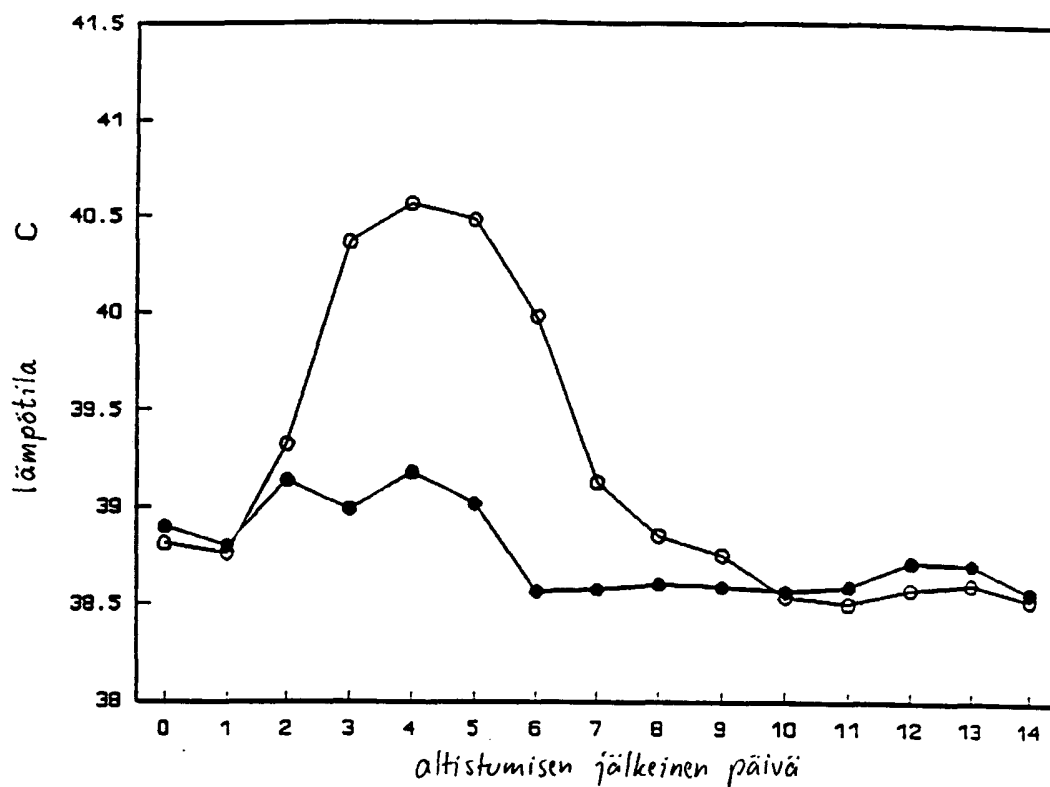


FIG.19

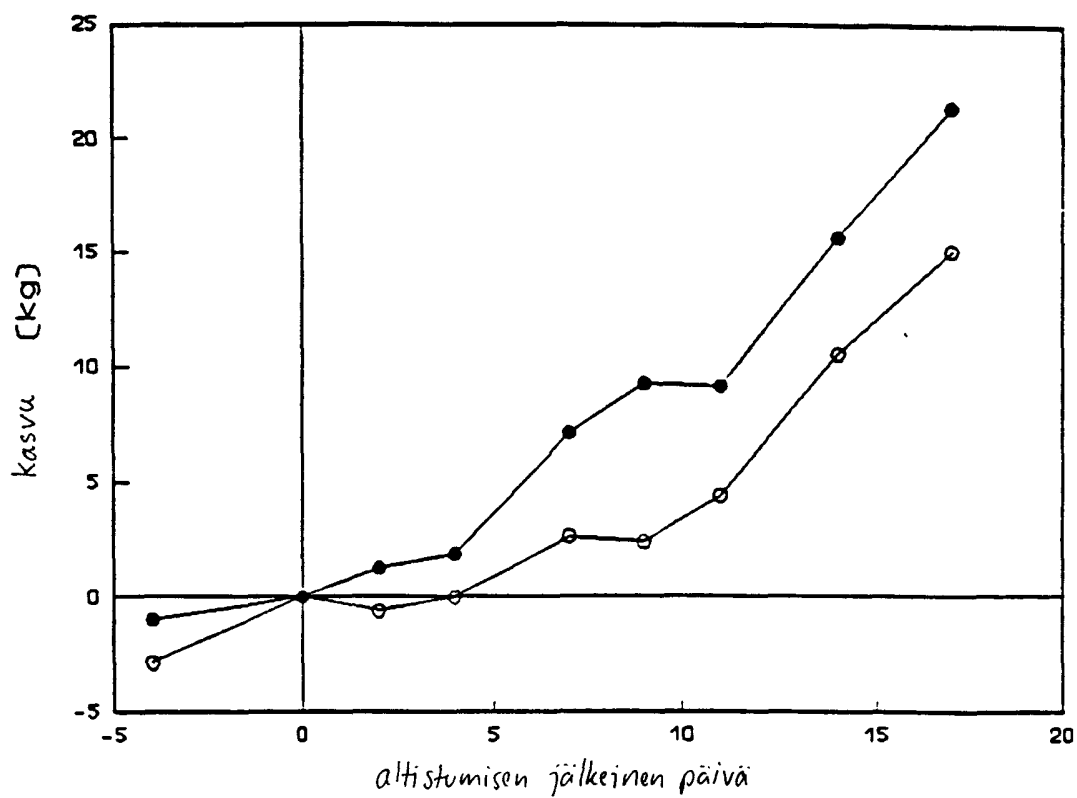


FIG.20

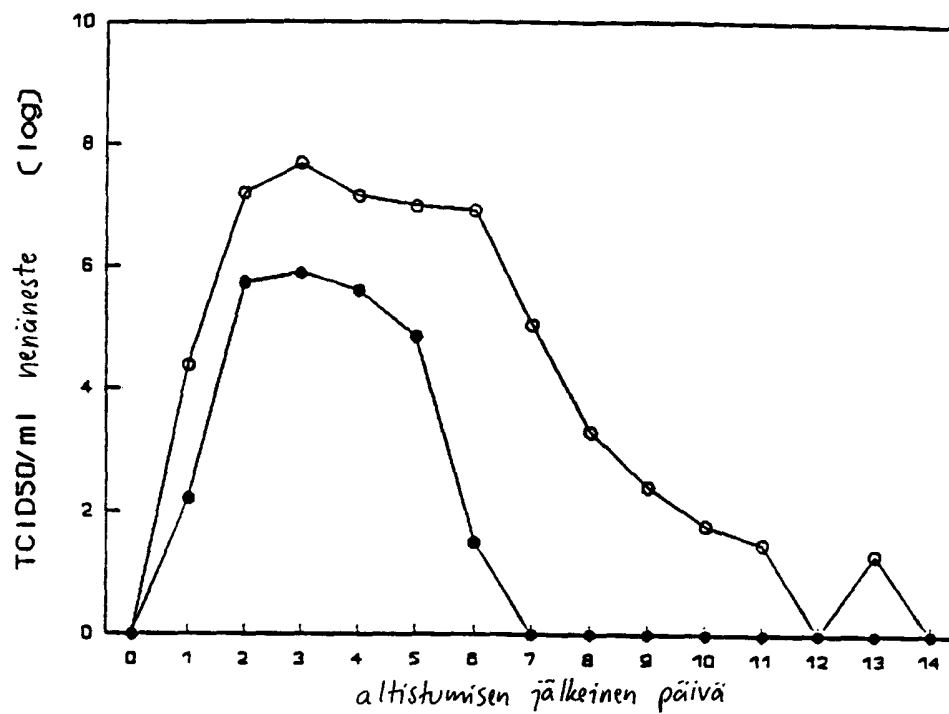


FIG. 21

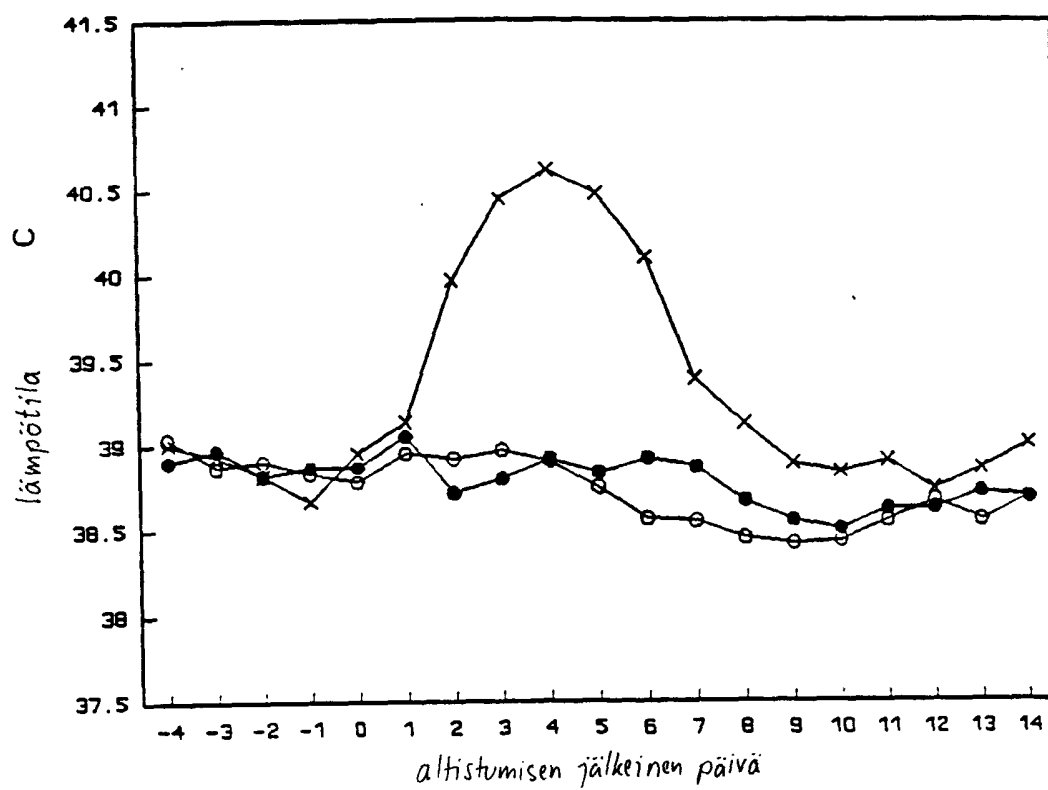


FIG. 22

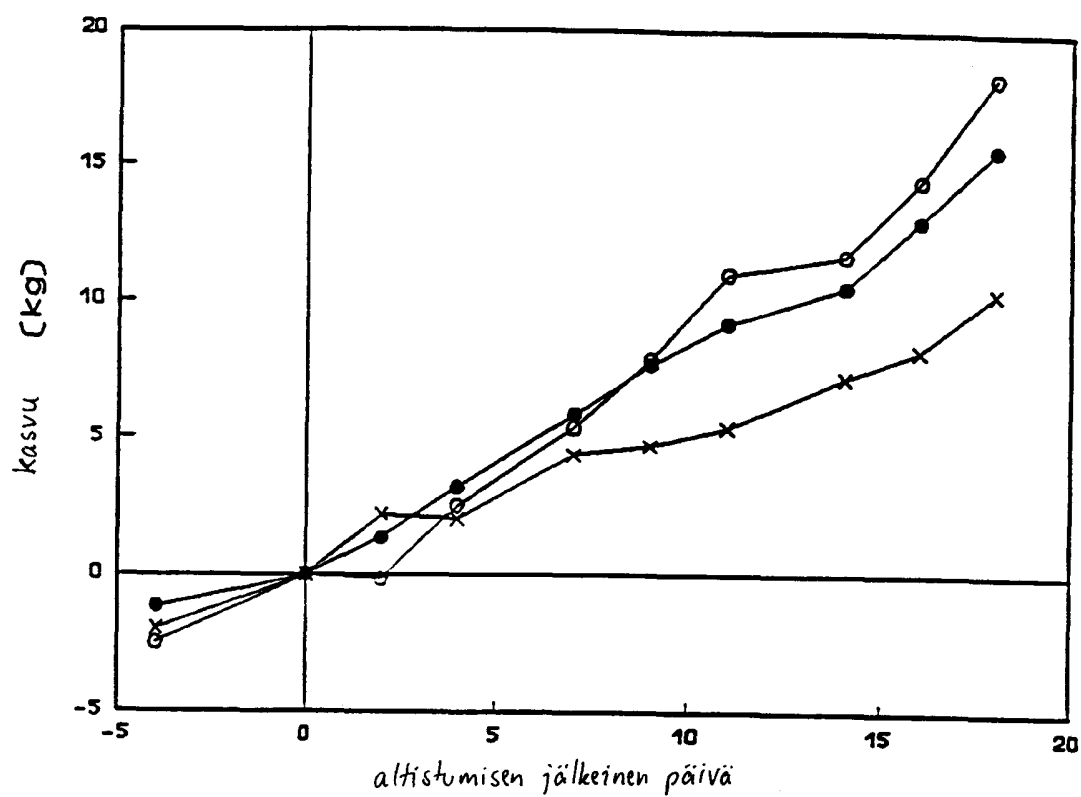


FIG. 23

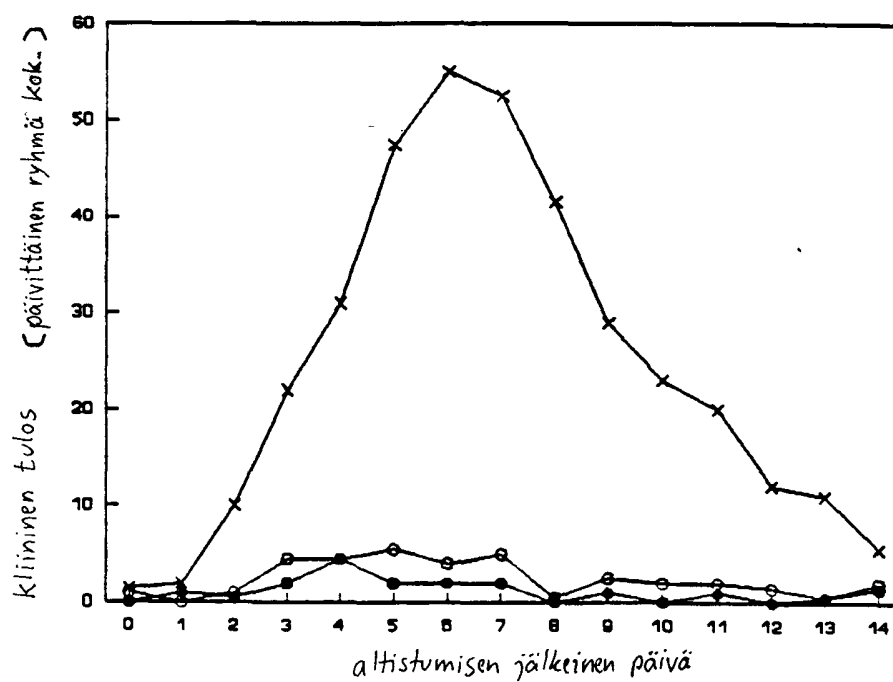


FIG. 24