



(19) **REPUBLIKA HRVATSKA**
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO

(10) Identifikator
dokumenta:



HR P940668 A2

HR P940668 A2

(12) **PRIJAVA PATENTA**

(51) MKP⁶: **C 12 N 15/35**
A 61 K 39/12

(21) Broj prijave: P940668

(22) Datum podnošenja prijave patenta: 12.10.1994.

(43) Datum objave prijave patenta: 31.12.1997.

(31) Broj prve prijave: 9002008

(32) Datum podnošenja prve prijave: 12.09.1990.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: NL

(60) Podaci iz bivšeg SZP-a:

⁽²¹⁾P-1508/91; ⁽²²⁾11.09.1991.

(71) Podnositelj prijave:

Aesculaap B.V., Mijlstraat 35, 5281 LJ Boxtel, NL

(72) Izumitelji:

Matheus Hubertus Maria Noteborn, Zeeforel 14, 2318 MP Leiden, NL

Gerben Foppe de Boer, Jagersveld 34, 8222 AC Lelystad, NL

(74) Zastupnik:

CPZ - CENTAR ZA PATENTE d.o.o., Zagreb, HR

(54) Naziv izuma: **REKOMBINANTNE DNA I RNA I IZ NJIH IZVEDENI PRODUKTI**

(57) Sažetak: Rekombinantna genska informacija (DNA ili RNA) koji obuhvaća nukleotidnu sekvenciju, specifičnu za virus pileće anemije (CAV), i njezina uporaba za dijagnostiku, cijepljenje ili proizvodnju proteina. Rekombinantni protein CAV i njegova upotreba za dijagnostiku, cijepljenje ili produkciju protutijela specifičnih za CAV. Uporaba tako dobivenih protutijela specifičnih za CAV.

HR P940668 A2

OPIS IZUMA**Područje izuma**

Taj izum spada u područje genetskoga inženjerstva (genska manipulacija) s tehnologijom rekombinantne DNA (i RNA), dijagnostike i imunizacije/vakcinacije. Podrobnije, izum se odnosi na otkrivanje, kloniranje i analizu sekvencije genoma DNA virusa pileće anemije (CAV) i na uporabe koje su time omogućene.

Pozadina izuma

Virus CAV, koji do sada još nije bio klasificiran, prouzročuje infekcijsku anemiju u pilića. Virus su najprije izolirali u Japanu godine 1979., a ime je dobio zbog ozbiljne anemije koju prouzročuje u mladim pilića (Yuasa et al., 1979). Ostali simptomi zaraze s CAV su atrofija koštane srži i razaranje limfocita u timusu. Do oštećenja dolazi u slezeni i u jetri.

Najosjetljiviji su jednodnevni pilići. U tih životinja se 4 do 7 dana nakon inokulacije s CAV opaža letargija, anoreksija i prijelazna anemija, te oko polovica životinja uginu približno 2 do 3 tjedna nakon zaraze. S povećanjem starosti raste i prirodna otpornost. U starosti od 7 dana se nakon zaraze pojavi u pilića samo prijelazna anemija, a u 14 dana starih životinja nakon zaraze uopće ne dođe do anemije. Zaštita od zaraze s CAV i simptoma bolesti od CAV temelji se u velikoj mjeri na mehanizmima humoralne imunske obrane. Vielitz (1989) je razvio praktičnu, prilično djelotvornu metodu sprječavanja pomoću "kontrolirane izloženosti" suspenzijama s CAV-om inficiranih jetara kokoši nesilica, čime potomak dobiva imunost po majci. U Njemačkoj upotrebljavaju tu metodu u praksi, iako izgleda da nije potpuno bez rizika.

Pokusi na životinjama izvedeni u izoliranim kokošjim farmama u Centraal Diergeneeskundig Instituut (CDI) u Lelystadu potvrdili su zaštitnu vrijednost majčinih protutijela. Tu su izveli "kontroliranu izloženost" s CAV razmnoženim u tkivnim kulturama. Nazočnost majčinih protutijela protiv CAV, potpuno je spriječila razmnožavanje CAV nakon zaraze jednodnevnih pilića od majki tako vakciniranih. Niti simptomi CAV nisu se pojavili. Ta pasivna zaštita postigla se i u potomaka imuniziranih kokoši nesilica, kao i nakon uštrcavanja ekstrakta žumanjaca iz jaja tih istih imuniziranih kokoši nesilica, pilićima koji su bili specifično bez patogenih uzročnika (SPF). Pasivna zaštita glede zaraze s CAV davanjem protutijela protiv CAV trajala je do starosti od 4 tjedna. Nakon toga se ustanovilo, da je pasivna zaštita bila nepotpuna. Ti pokusi su pokazali, da majčina protutijela proizvedena vakcinacijom životinja-majki, imaju važni preventivnu ulogu u praktičnim okolnostima.

Pokusima se također dokazalo, da u pilića koji prežive zarazu CAV-om, dolazi do prijelaznog nestanka specifične populacije timusnih limfocita (Jeurissen et al., 1989). Timusna atrofija je možebitni uzrok imunosupresiji koju prouzročuje CAV, što ima za posljedicu da su specifične vakcinacije, primjerice protiv kokošje kuge (bolest Newcastle), manje djelotvorne. CAV je više puta izoliran u jatima s povećanim gubitkom zbog Marekove bolesti, Gumborove bolesti (virus infekcijske bolesti burze, IBDV; Yuasa et al., 1980) i u životinja oboljelih od bolesti Blue Wing, u svezi s reovirusima (Engström, 1988a, Engström et al., 1988b). Eksperimentnim dvostrukim zarazama dokazana su stupnjevita svojstva CAV-a glede drugih virusa u pilića, na pr. virusa Marekove bolesti, MDV, De Boer et al., 1989a). Nedavno smo u našim vlastitim pokusima opazili izrazito pojačanu reakciju na okulaciju nakon aerosolne vakcinacije vakcinom protiv kokošje kuge i istodobne zaraze s CAV-om. CAV onda dovodi do imunosupresivnih i stupnjevitih učinaka na druge virusne zaraze. Ta svojstva virusa CAV vjerojatno prouzrokuju povećanu učestalost izbijanja virulentnih bolesti u praksi.

Izgleda da je CAV raširen po cijelom svijetu. Malo nakon što je počelo istraživanje u Japanu, izvedene su prve izolacije u Europi, najprije Von Büllow u Njemačkoj (1983) i kasnije McNulty et al. u Ujedinjenom kraljevstvu (1990). U Nizozemskoj su prve izolacije iz materijala iz SAD, Izraela i Tunisa izveli De Boer et al. (1988). Raspoloživi literaturni podaci pokazuju da izolati spadaju u jedan serotip, iako treba različite terenske izolate testirati glede njihove međusobne srodnosti i mogućih razlika u patogenosti (McNulty et al., 1990). CAV se u jati širi vjerojatno preko izmeta i zraka. Međutim, važnu ulogu u epidemiologiji CAV-a ima i vertikalno prenošenje virusa na potomke. Nazočnost CAV-a je serološki dokazana u raznim državama.

U uvjetima tkivne kulture CAV se teško razmnožava. Do sada CAV prouzročuje samo citopatološki učinak (CPE) u limfoblastoidnim staničnim linijama iz limfoma Marekove bolesti, transformiranih s MDV (stanice MDCC-MSB1) ili s virusom avianske leukemije (ALV) transformiranih limfoblastoidnih staničnih linija iz limfoidne leukoze (stanice 1101-X5; Yuasa, 1983). U nedavnoj studiji opisuju Todd et al. (1990) virusne čestice (u očišćenom materijalu CAV) promjera 23.5 nm, koji se koncentriraju u gustoći od 1.33 do 1.34 g/ml u gradijentu CsCl. Virus ima jedan prevladavajući polipeptid (Mr: 50000) i genom prstenaste jednolančane DNA duljine 2.3 kilobaze. Dva mala virusa, svinjski Circovirus i virus koji je povezan s bolešću kljuna i perja u papiga, su glede prstenaste jednolančane DNA slični CAV-u, iako imaju manji genom i manji promjer virusnih djelića (Ritchie et al., 1989; Tischer et al., 1982).

Dugo se smatralo da CAV spada u parvoviruse. Zapravo su većina parvovirusa virusi s jednolančanom DNA, imaju linearnu DNA, veći genom, te vjerojatno i drugačiji sastav virusnih polipeptida.

Kratak opis izuma

- 5 Općenito vrijedi, da su stanične komponente koje sudjeluju u udvostručavanju i prepisivanju virusa, funkcionalne samo, ako DNA ima dvolančani oblik. Virus koji ima prstenastu jednolančanu DNA može se u stanici pojaviti u fazi, u kojoj se sastoji iz dvolančane DNA. To smo djelovanje iskoristili mi, pronalazači.
- 10 Karakterizirali smo dvolančanu CAV DNA duljine 2.3 kilobaznoga para u stanicama 1104-X5 i MDCC-MSB1 zaraženih s CAV, te ju klonirali u pIC-20H. DNA smo u cijelosti odredili sekvenciju (vidi sl.1). U dijagnostičkom testu s obilježenom kloniranom CAV-DNA dokazali smo nukleinske kiseline virusa CAV u preparatima virusa, jetre i tkivnih kultura. Utvrdili smo, da CAV ima sva biološka i patogene svojstva divljeg tipa CAV, kako u tkivnoj kulturi, tako i u testovima sa životinjama.
- 15 Lančana reakcija s polimerazom (PCR) i hibridizacijski pokusi pokazali su da CAV koji nađemo na terenu, odgovara kompletnom kloniranom genomu CAV. Pomoću Southern analiza sa sondama DNA, obilježenima s ³²P dokazali smo da su svi terenski izolati sadržavali molekule DNA duljine 2.3 kb. Analize s restriktivnim enzimima su pokazale da DNA kloniranog CAV odgovara DNA terenskih izolata. U testu s kapljčnim nanosom ("dot blot") smo dokazali DNA kloniranog CAV-a označena digoksigeninom, specifično hibridizira s DNA različitih terenskih izolata. U pokusima s PCR uz uporabu oligonukleotida kojih je sekvencija bila izvedena iz sekvencije kloniranog CAV (sl. 4), specifično smo umnožili ili prepoznali CAV-DNA.

Podroban opis izuma

- 25 Sadašnji izum osigurava u prvom redu rekombinantnu gensku informaciju u obliku obilježene ili neobilježene DNA ili RNA, koja obuhvaća nukleotidnu sekvenciju specifičnu za virus anemije pilića (CAV), koja se podudara ili koja je komplementarna nukleotidnoj sekvenciji genoma CAV ili njegovoga dijela.
- 30 U prednosti je izvedba sadašnjega izuma koja se sastoji iz takove rekombinantne genske informacije, koja obuhvaća nukleotidnu sekvenciju specifičnu za CAV, koja se podudara ili koja je komplementarna nukleotidnoj sekvenciji, prikazanoj na slici 1, nukleotidnu sekvenciju koja je s njom najmanje u 60 % homologna, ili njezin dio.
- 35 Taj vid pronalaska sastoji se iz nukleinske kiseline, odbrane između DNA i RNA, u bilo kojemu mogućem pojavnom obliku, kako u obliku gole DNA ili RNA, tako i u obliku na bilo koji način pakovane DNA ili RNA (u proteinima ili u virusnim česticama), ili povezane na druge tvari (na pr. s nosačem ili materijalom koji ima učinak obilježivača). DNA može biti jednolančana kao i dvolančana DNA, i može biti kako u linearnom tako i u prstenastom obliku.
- 40 Za rekombinantnu gensku informaciju u skladu s pronalaskom važno je, da je u njoj nazočna nukleotidna sekvencija specifična za CAV. Nije potrebno da ta, za CAV specifična sekvencija, obuhvaća sveukupan genom CAV, a za veći dio uporabe će sa praktičnoga stajališta, biti potreban i poželjan samo specifični dio.
- 45 Prva mogućnost u prednosti je nukleotidna sekvencija specifična za CAV, koja se podudara ili koja je komplementarna nukleotidnoj sekvenciji, koja kodira protein CAV i koja se pojavljuje u genomu CAV, ili njezin dio. Rekombinantnu DNA koja obuhvaća tako kodiranu sekvenciju, možemo upotrijebiti na pr. za otkrivanje informacijske RNA virusa CAV u uzorku, ili ju možemo upotrijebiti na pr. u okviru postupka pripreme proteina CAV ili njihovih dijelova. Izraz "njihov dio" označuje načelno svaki dio koji se može smatrati specifičnim za CAV. Na razini proteina će to za većinu uporaba biti epitop, to je antigenska determinanta koju mogu prepoznavati antitijela.
- 50 Druga mogućnost je, da rekombinantna genska informacija u skladu s pronalaskom obuhvaća nukleotidnu sekvenciju specifičnu za CAV, koja se podudara ili koja je komplementarna nukleotidnoj sekvenciji, koja ima regulacijsku funkciju što se pojavljuje u genomu CAV, ili njezin dio.
- 55 Jedan primjer je uporaba promotorskih/poticajnih elemenata u kombinaciji sa sekvencijama koje kodiraju protein, koji je različit od proteina CAV, na pr. omogućavanje izražavanja takovih proteina koji nisu proteini CAV, u peradi (kao pilići) i drugih životinja, u kojih djeluju regulacijski signali virusa CAV.
- 60 Tako u gornjem primjeru općenito može rekombinantna genska informacija u skladu s pronalaskom obuhvaćati i nukleotidnu sekvenciju koja nije izvedena iz genoma CAV. Tu "nukleotidnu sekvenciju koja nije izvedena iz genoma CAV" može tvoriti na pr. nukleotidna sekvencija izvedena iz prokariotičnoga ili eukariotičnoga vektora za izražavanje. Tako izum obuhvaća mogućnost uključivanja sekvencije specifične za CAV u (virusni ili nevirusni) vektor, prikladan

za izražavanje u eukariotičnih organizama ili u plazmida, prikladan za izražavanje u bakterija. Nadalje je također moguće, da obuhvaća rekombinantna genska informacija u skladu s pronalaskom kao “nukleotidnu sekvenciju koja nije izvedena iz genoma CAV”, nukleotidnu sekvenciju koja se ne pojavljuje u genomu CAV, koji ima regulacijsku funkciju.

5 “Nukleotidna sekvencija koja nije izvedena iz genoma CAV” može se sastojati i iz nukleotidne sekvencije koja kodira protein (dio proteina) koji je različit od proteina CAV, na pr. ako se upotrijebe regulacijski signali CAV za izražavanje takovoga proteina koji nije protein CAV (ili njegovoga dijela), u domaćina, koji je dostupan virusu CAV, ili ako se namjerava rekombinantnu DNA upotrijebiti za pripremu hibridnog ili fuzijskog proteina u kojemu djeluje protein CAV kao nositelj za epitop proteina, koji nije protein CAV, ili naprotiv, protein koji nije protein CAV, djeluje kao nositelj za epitop proteina CAV.

Ako namjeravamo upotrijebiti rekombinantnu gensku informaciju u skladu s pronalaskom u okviru postupaka za otkrivanje komplementarne DNA ili RNA u uzorku, može biti potrebna nazočnost obilježivača. Obilježivač, koji se tu upotrebljava, je marker prikladan za uporabu s DNA ili RNA, koji omogućuje ili olakšava otkrivanje obilježene DNA ili RNA. Stručnjak pozna mnogo vrsta markera, prikladnih za tu svrhu, kao što su radioizotopi (na pr. ³²P), enzimske molekule (na pr. peroksidaze), hapteni (na pr. biotin), fluorescentne tvari, bojila, pigmenti (na pr. anorganski fosfori), te markeri u obliku čestica (na pr. čestice zlata ili selen). U drugom pogledu se izum odnosi na uporabu rekombinantne genske informacije, kao što je gore definirana, osobito u dijagnostičke svrhe, svrhu imunizacije ili vakcinacije, ili za pripremu proteina CAV, ili proteina koji nisu proteini CAV.

25 Podrobnije se na pr. odnosi na uporabu rekombinantne genske informacije u skladu s pronalaskom, kao sonde, ili primjera koji su specifični za CAV, u postupku za otkrivanje CAV-DNA ili -RNA, na pr. u postupku nanošenja DNA/RNA u obliku mrlje (“slot blotting”), Southern upijanja, Northern upijanja, hibridizacije in situ, umnožavanja DNA pomoću PCR, S1 mapiranja i ekstenzije primjera, pri čemu izum obuhvaća dijagnostički komplet za otkrivanje CAV-DNA ili -RNA u postupku, kao što je nanošenje DNA/RNA u obliku mrlje (“slot blotting”), Southern upijanje, Northern upijanje, hibridizacija in situ, umnožavanje DNA pomoću PCR, S1 mapiranje ili ekstenzija primjera, pri čemu taj dijagnostički komplet sadrži rekombinantnu gensku informaciju u skladu s pronalaskom kao sondu ili primjer, koji su specifični za CAV.

30 Nadalje, odnosi se na uporabu rekombinantne genske informacije u skladu s pronalaskom kao žive virusne vakcine za zaštitu protiv CAV ili drugoga patogenog uzročnika, pri čemu izum obuhvaća i vakeinski pripravak za imuniziranje protiv CAV ili drugoga patogenog uzročnika, pri čemu obuhvaća taj pripravak rekombinantnu gensku informaciju u skladu s pronalaskom i u danom primjeru jedan ili više nositelja i adjuvansa, prikladnih za žive virusne vakcine.

35 Odnosi se također na uporabu rekombinantne genske informacije u skladu s pronalaskom kao vektora za kloniranje, to jest na uporabu CAV-DNA kao nekakvoga “eukariotičnoga plazmida” za avianske sustave, u kojima su genski fragmenti ugrađeni u potpuni ili skoro potpuni genom CAV.

40 Obuhvaća također uporabu rekombinantne genske informacije u skladu s pronalaskom u postupku za pripremu proteina CAV, njegovoga dijela, ili proteina koji je različit od proteina CAV s prevođenjem in vitro ili in vivo. Isto vrijedi za prokariotičnu ili eukariotičnu stanicu koja sadrži rekombinantnu gensku informaciju, kako je gore definirana, i posebice za prokariotičnu ili eukariotičnu stanicu koja je sposobna za izražavanje uvijek jednoga proteina kojega kodira rekombinantna genska informacija u skladu s pronalaskom. Te različite mogućnosti ćemo opširnije obrazložiti niže u ovom opisu.

45 Sljedeći vid izuma odnosi se na protein CAV ili njegov dio, dobiven in vitro prevođenjem rekombinantne genske informacije u skladu s pronalaskom, koja sadrži nukleotidnu sekvenciju koja kodira protein CAV ili njegov dio, kao i protein CAV ili njegov dio, dobiven izolacijom iz prokariotične ili eukariotične stanice koja sadrži rekombinantnu gensku informaciju u skladu s pronalaskom, koja sadrži nukleotidnu sekvenciju koja kodira protein CAV ili njegov dio, i koja je sposobna za njegovo izražavanje.

50 Na razini proteina obuhvaća izum također različite uporabe, posebice uporabu proteina CAV ili dijela proteina u skladu s pronalaskom za dijagnostičke svrhe, za imunizacijske ili vakcinacijske svrhe ili za proizvodnju protutijela specifičnih za CAV. Konkretnije, izum obuhvaća uporabu proteina CAV ili dijela proteina, kako je gore definiran, kao reagensa koji veže za CAV specifična protutijela, u postupku imunskog testa za otkrivanje za CAV specifičnih protutijela, na pr. bojenjem imunoperoksidazom, testom ELISA ili imunofluorescencijskim testom, i tomu odgovarajućega dijagnostičnog kompleta za otkrivanje za CAV specifičnih protutijela u postupku imunskog testa, kao što je bojenje imunoperoksidazom, test ELISA ili imunofluorescencijski test, pri čemu obuhvaća taj dijagnostički komplet protein CAV ili dio proteina u skladu s pronalaskom kao reagens koji veže za CAV specifična protutijela.

Izum obuhvaća također i uporabu proteina CAV ili dijela proteina, kako je gore definiran, kao vakcine koja obuhvaća samo podjedinicu, za zaštitu protiv CAV, kao i vakcinski pripravak protiv CAV, pri čemu obuhvaća taj vakcinski pripravak protein CAV ili dio proteina u skladu s pronalaskom i u danom primjeru jedan ili više nositelja i adjuvansa prikladnih za vakcine, koji obuhvaćaju samo podjedinicu.

5 Uporaba proteina CAV ili dijela proteina, kako je gore definiran, u postupku za proizvodnju za CAV specifičnih poliklonskih ili monoklonskih protutijela spada također u mogućnosti koje su u okviru izuma. Sve te uporabe ćemo opširnije obrazložiti niže u ovom opisu.

10 U daljnjem pogledu se izum odnosi također na protutijela specifična za CAV, proizvedena pomoću proteina CAV ili dijela proteina, kako je gore definiran, kao i na različitu uporabu takvih, za CAV specifičnih protutijela, na pr. za dijagnostičke svrhe, imunizacijske ili vakcinacijske svrhe, ili za preparativne svrhe.

15 Konkretnije, odnosi se na uporabu za CAV specifičnih protutijela u skladu s pronalaskom, kao reagensa za vezanje proteina CAV u postupku imunskoga testa za otkrivanje proteina CAV, kao i dijagnostičnoga kompleta za otkrivanje proteina CAV u postupku imunskoga testa, pri čemu sadrži taj dijagnostički komplet za CAV specifična protutijela u skladu s pronalaskom, kao reagens za vezanje proteina CAV.

20 Daljnji primjer je uporaba za CAV specifičnih protutijela u skladu s pronalaskom, za pasivnu imunizaciju protiv zaraze s CAV, kao i imunizacijski pripravak za pasivnu imunizaciju protiv CAV, pri čemu taj pripravak obuhvaća za CAV specifična protutijela u skladu s pronalaskom i u danom primjeru jedan ili više nositelja i adjuvansa prikladnih za pripravke za pasivnu imunizaciju. Specifično vrijedi za imunizaciju kokoši nesilica s rekombinantnim produktima u skladu s pronalaskom.

25 Što se tiče preparativnih uporaba, jedan je primjer uporaba za CAV specifičnih protutijela u skladu s pronalaskom u postupku za izoliranje i/ili čišćenje proteina CAV. Najvažnije uporabe opširnije ćemo objasniti u sljedećem podrobnom opisu izuma.

Primjeri

30 Analiza niskomolekulske DNA izolirane iz stanica zaraženih s CAV

Pokazalo se, da je genom CAV, izoliran iz očišćenoga virusnog preparata, molekula prstenaste jednolančane DNA duljine oko 2300 baza (Todd et al., 1990). Pretpostavili smo, da se u stanicama zaraženih CAV-om nalazi osim
35 prstenaste jednolančane DNA i prstenasta dvolančana CAV-DNA. Dvolančana DNA može se razrezati restriksijskim enzimima, te ju je stoga moguće, za razliku od jednolančane DNA, izravno klonirati. Glede toga smo ispitivali, nalazi li se u niskomolekulskoj frakciji stanica zaraženih s CAV-om produkt DNA, koji nije postojao u nezaraženim stanicama.

Niskomolekulsku DNA izolirali smo iz stanica MDCC-MSB1 i 1104-X5 zaraženih s CAV-om, te iz nezaraženih stanica
40 1104-X5. DNA smo frakcionirali na gelu agar/etiđijev bromid. U gelu je bila vidljiva vrlo slaba mrlja DNA (izmjerene) duljine oko 3 kilobazna para (kbp). Taj specifični produkt DNA nije bio prisutan u DNA izoliranoj iz nezaraženih stanica. Veću vjerojatnost da je specifična DNA bila prisutna samo u stanicama zaraženih s CAV, dokazali smo ovim pokusom: DNA izoliranu iz zaraženih stanica odvojili smo po duljini pomoću agarškoga gela. Izolirali smo DNA
45 DNA smo radioaktivno obilježili i s njom hibridizirali po Southernu preslikanu niskomolekulsku DNA, iz stanica zaraženih s CAV i iz nezaraženih stanica. Na visini od 3 kbp je u preslika stanica zaraženih s CAV hibridizirao produkt DNA koji je bio odsutan u presliku DNA nezaraženih stanica.

Duljinu 3 kbp smo odredili markerima DNA koji se sastoje iz molekula dvolančane linearne DNA. U agarškome dijelu
50 je ponašanje molekule prstenaste dvolančane DNA drugačije od ponašanja fragmenata linearne DNA. DNA s 3 kbp iz stanica zaraženih s CAV mogla bi biti linearna DNA koja zapravo ima 2.3 kbp.

Ako prstenastu dvolančanu DNA razgradimo restriksijskim enzimom koji zarezuje u molekulu DNA samo jedan put,
55 mora nastati molekula lineane DNA (izmjerene) duljine 2.3 kbp. Točnost te pretpostavke dokazali smo tako da smo odvojeno inkubirali niskomolekulsku DNA izoliranu iz stanica 1104-X5 zaraženih s CAV, sa šest različitih restriksijskih enzima (BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI, PstI i XbaI). Southern presliku niskomolekulske DNA izolirane iz stanica 1104-X5 zaraženih s CAV i razrezanih gornjim restriksijskim enzimima, hibridizirali smo s gornjom radioaktivno obilježenom sondom DNA.

To je pokazalo da je obradba s restriksijskim enzimima BamHI, EcoRI, PstI i XbaI imala za posljedicu molekulu DNA
60 s izmjerenom duljinom 2.3 kbp. DNA nezaraženih stanica inkubiranih s BamHI nije sadržavala taj produkt DNA. Restriksijski enzim HindIII je dva puta zarezao DNA, a KpnI ju nije zarezao.

Iz gornjih pokusa možemo zaključiti da se u niskomolekularnoj staničnoj DNA zaraženoj s CAV pojavljuje molekula prstenaste DNA duljine 2.3 kbp, koja ne postoji u nezaraženim stanicama, te da je to genom CAV u obliku molekule prstenaste dvolančane DNA.

5

Kloniranje i subkloniranje dvolančane CAV-DNA u bakterijski vektor

Niskomolekularnu DNA stanica 1104-X5 zaraženih s CAV odvojeno smo inkubirali s BamHI, EcoRI, PstI i XbaI. DNA smo odvojili na agarском gelu niskoga tališta. Iz sva četiri DNA-preparata izolirali smo molekulu DNA duljine 2.3 kbp. Klonirani vektor pIC-20H odvojeno smo razgradili s ista četiri restrikcijska enzima, s kojima smo razrezali niskomolekularnu DNA. Linearni vektor smo obradili “telećom crijevnom alkalnom fosfatazom”. Svaki fragment DNA duljine 2.3 kbp povezali smo na odgovarajućem mjestu za restrikcijski enzim pIC-20H. Produkte vezanja transfektirali smo u nasad E. coli HB101. Sva 4 kloniranja su dala plazmide, koji su sadržavali uključke DNA duljine oko 2.3 kbp. Daljnja analiza s restrikcijskim enzimom pokazala je, da je najmanje 7 plazmida sadržavalo isti fragment DNA. Mjesto uključanja u vektoru je zbog uporabe različitih enzima za otvaranje prstenaste molekule bilo različito. Pomoću restrikcijskih enzima BamHI, EcoRI, PstI i XbaI odredili smo restrikcijsku enzimsku mapu sva četiri klona CAV-DNA.

15

Četiri “različita” plazmida CAV-DNA radioaktivno smo obilježili i hibridizirali sa Southern preslikom DNA izolirane iz stanica zaraženih s CAV i razgrađene pomoću BamHI, te iz nezaraženih stanica. Svi testirani kloni hibridizirali su samo s molekulom DNA duljine 2.3 kbp, koja je prisutna u DNA stanica zaraženih s CAV.

20

Biološka aktivnost dva klona CAV-DNA

Dva klona CAV, pIC-20H/CAV-EcoRI i pIC-20H/CAV-PstI razgradili smo restrikcijskim enzimima tako, da smo CAV-DNA potpuno odrezali od vektora. Molekule linearne CAV-DNA obradili smo s T₄-DNA ligazom. Time smo linearne DNA sklopili u prsten. “Klonirana” CAV-DNA sada je imala dvolančani prstenast oblik, koji ima i divlja CAV-DNA u zaraženim stanicama. Stanice MDCC-MSB1 i 1104-X5 transfektirali smo s “kloniranim” prstenastim CAV-DNA. Za klon pIC-20H/CAV-EcoRI smo u oba stanična tipa utvrdili vrlo jasan citopatogeni učinak (CPE). Klon pIC-20H/CAV-PstI prouzročio je vrlo jasan CPE u stanica MDCC-MSB1, te manje jasan CPE u stanica 1104-X5. Međutim, supernatanti stanica 1104-X5 transfektiranih s pIC-20H/CAV-PstI prouzročili su jasan CPE u stanica MDCC-MSB1. Transfekcije s DNA izoliranih iz stanica zaraženih s CAV, također su prouzročile jasan CPE u stanica MDCC-MSB1, dok je u stanica 1104-X5 opažen manje jasan CPE. Nakon transfekcije stanica MDCC-MSB1 ili 1104-X5 s vektorom pIC-20H DNA nismo dobili CPE.

25

30

Southern analiza pokazala je da je u staničnim cijepanim stanicama MDCC-MSB1 i 1104-X5 zaraženih virusom (pasaza 6), dobivenih s kloniranim CAV-DNA, prisutna CAV-DNA.

35

Neutralizacijski test sa stanicama MDCC-MSB1 je pokazao da je CPE koji je prouzročila klonirana DNA u transfektiranih stanica, bio posljedica zaraze s CAV. Neutraliziranje protutijela usmjerenih protiv CAV, spriječilo je CPE stanica MDCC-MSB1, zaraženih s CAV-potomstvom transfektiranih stanica.

40

Jednodnevnim pilićima smo intramuskularno ubrizgali supernatant transfektiranih stanica. U pilića su supernatanti prouzročili istu kliničku sliku kao i tip divljega CAV: zakašnjeli rast koji se očituje u ukupnoj tjelesnoj masi, blijeda koštana srž i smanjenje vrijednosti hematokrita (anemija), atrofija timusa (smanjenje specifične populacije stanica T) i smrtnost. Supernatanti stanica, transfektirani s vektorskom DNA, nisu prouzročili simptome bolesti u pilićim kontrolama.

45

Analiza sekvencija genoma dvostrukovijčane CAV-DNA

U cjelokupnom genomu dvostrukovijčane CAV-DNA odredili smo sve sekvencije pomoću Sangerove metode (Sanger et al., 1977) i Maxam-Gilbertove metode. Pomoću primjera za određivanje sekvencije M13 i primjera za određivanje sekvencije u obrnutom smjeru M13, odredili smo sekvenciju DNA od oko 2100 baza 4 klona pIC-20H/CAV (BamHI, EcoRI, PstI i XbaI). Potom smo subklonirali genom CAV. Od pet različitih subklona genoma CAV-DNA odredili smo sekvenciju DNA po Sangerovoj metodi pomoću primjera M13 i/ili po Maxam-Gilbertovoj metodi. Na taj smo način odredili sekvenciju DNA oba lanca genoma CAV.

55

Duljina (dvolančane) DNA virusa CAV je 2319 bp. Prvi bazni položaj EcoRI prstenastoga sustava genoma CAV označimo s +1. Sekvencija lanca DNA koja sadrži većinu/najveći otvoreni okvir koji se čita, prikazana je na slici 1, a nazivamo ga (+)-lancem. Sastav baza toga lanca je 25.5 % adenina, 28.7 % citozina, 27.7 % guanina i 18.1 % timina. Računska ispitivanja o mogućoj homolognosti genoma CAV s već poznatim virusnim sekvencijama su pokazala, da

60

DNA još nije bila opisana i da nije tvorila dio neke ranije opisane skupine virusa. Prva pretpostavka, da je CAV parvovirus, više nije održiva, ukoliko slijedi sekvenciju i oblik genoma CAV-DNA (prstenasta).

Pomoću računskih istraživanja karakterizirali smo organizaciju genoma CAV. Predviđeni su otvoreni okviri koji se čitaju, promotorski/poticajni elementi, signal i položaj poliadenilacije i "izvor podvostručanja". Slika 2 prikazuje predviđene otvorene okvire koji se čitaju, veće od 300 baza, za oba lanca DNA virusa CAV. Slika 2A prikazuje otvorene okvire koji se čitaju, počevši s kodonom ATG. Kodon ATG je početni kodon, koji se najčešće upotrebljava za proteine. Vrijedno je spomenuti, da jedan od oba lanca DNA kodira za 3 proteina duljine 449 aminokiselina (51.6 kDa), 216 aminokiselina (24 kDa) i 121 aminokiselina (13.3 kDa). Todd et al. (1990) dokazali su u očišćenom CAV protein s 50 kDa. Ako su uistinu upotrijebljeni svi otvoreni okviri koji se čitaju, prevede se u protein oko 80 % virusnoga genoma. Neka područja se čak podvostručuju. Potpuno je moguće da su 3 otvorena okvira koji se čitaju prevedena iz 1 RNA. Pretpostavljeni začetak molekule RNA je u položaju 354 i poli(A) adicija u položaju 2317. Jedini poli(A) signal je u položaju 2287 plus lanca.

Malo je vjerojatno da su otvoreni okviri koji se čitaju u drugom lancu DNA, jer tome lancu nedostaju neke važne regulacijske sekvencije. Slika 2B i slika 2C prikazuju otvorene okvire koji se čitaju, koji upotrebljavaju CTG, odnosno GTG kao početni kodon. Međutim, opisano je za malo proteina, da su ti početni kodoni doista upotrijebljeni (Hann et al., 1988).

Računska istraživanja o sličnostima između posebnih proteina CAV i već poznatih proteina, pokazala su ograničenu homologiju na sekvencijama, koje su prisutne u programima što su na raspolaganju. Stoga je teško pretpostaviti kakvoj vrsti proteina su slični proteini CAV. Razmjerno blizu su proteini virusne kapside, proteini koji vežu DNA i proteini za koagulaciju krvi. Rezultati ovdje nisu navedeni.

Izražavanje proteina reguliraju elementi promotora/poticatelja (Jones, 1990). Eukariotični promotor leži najčešće upravo ispred početka prijepisa. Sekvencija CAV sadrži prema gore od mjesta modifikacije ("cap") općenite elemente: boks TATA, boks SP1 i boks CAAT. Sekvencija i položaji tih boksova izvrsno se slažu s onima koji su opisani u većine eukariotičnih promotora (tablica 1). Oko položaja 285 mogu biti mjesta vezivanja za četiri različita faktora za prepisivanje: CREB, MLTF, GT i PEA-I.

Eukariotični gen sadrži i elemente podsticatelja koji određuju snagu eukariotičnog promotora. Mogući elementi poticatelja su pet izravnih ponavljanja, koji svi imaju duljinu od 21 nukleotida i koji leže između položaja 144 i 260. Sva ponavljanja imaju 19 identičnih nukleotida. Samo zadnja dva nukleotida su različita. Ponavljanje 1 identično je 2, a 3 je jednako 5. Ponavljanja 1, 2 i 3 nalaze se jedno prema drugome slično kao 4 i 5. Između ponavljanja 3 i 4 je "prekid" s 12 nukleotida. Računsko istraživanje pokazuje da nijedan opisani (eukariotični) poticatelj ne sadrži sve sekvencije, utvrđene za vjerojatne elemente poticatelja CAV. Sva izravna ponavljanja sadrže element ATF koji može biti upleten u povećanje u prepisivanju ribonukleinskih kiselina CAV. Izravna ponavljanja sadrže dva puta sekvenciju CATCC i dva puta sekvenciju CAGCC. Zadnja sekvencija se prekriva s boksom CAAT. Te četiri sekvencije se samo jedan put ne slažu s boksom CACCC, opisanim za β -globin (tablica 1).

Slika 3 prikazuje da su približno među položajima 55 i 135 i među položajima 2180 i 2270 plus lanca DNA prisutne vrlo velike vlaknaste strukture u (jednolančanom) obliku DNA virusa CAV. Vlaknaste strukture u DNA mogu biti upletene u uvostručavanju CAV-DNA. Vlakna među 2180 i 2270 mogu biti prisutna ne samo u CAV-DNA, nego i u CAV-RNA, i vjerojatno imaju određenu ulogu u stabilnosti CAV-RNA.

Različiti oblici DNA virusa CAV u zaraženim stanicama

U Southern presliku preparata DNA iz stanica zaraženih s CAV, vidljive su četiri različite molekule CAV-DNA. DNA smo hibridizirali radioaktivnim obilježavanjem DNA klonu pIC-20H/CAV-EcoRI. Molekule CAV-DNA su glede njihovih izmjerenih duljina i oblika u agarском gelu koji ne prouzročuje denaturiranje, odnosno osjetljivosti za S1 nukleazu, dvolančani otvoreni prsteni (3 kbp), supersvijena dvolančana DNA (2 kbp), prstenasta jednolančana DNA (0.8 kbp) i jednolančana linearna DNA (1.5 kbp). Ponekad je vidljiv i linearni dvolančani oblik DNA virusa CAV (2.3 kbp). Todd et al. (1990) izmjerili su za prstenastu jednolančanu DNA iz izoliranoga CAV na temelju elektroforetske gibljivosti u agarском gelu, koji ne prouzročuje denaturiranje, duljinu od 0.8 kbp.

Otkrivanje CAV-DNA u virusnim preparatima

Iz CAV smo izolirali sveukupan CAV i očistili ga u skladu s metodom koju je opisao Von Büllow (1989). Preparat DNA smo analizirali u Southern analizi s označenom sandom CAV-DNA, koja sadrži cjelovitu kloniranu sekvenciju CAV. DNA, izolirana iz očišćenoga CAV, sadrži molekulu DNA duljine 0.8 kbp, izmjerenu u agarском gelu koji ne

prouzročuje denaturiranje. U Southern analizi DNA izolirane iz očišćenog CAV, s oligonukleotidima, izvedenim iz klonirane sekvencije CAV-DNA kao sondama, dokazali smo da je u virusu sadržan minus lanac DNA. Iz toga možemo lako zaključiti da je jednolančana DNA virusa CAV u kapsidi minus lanac.

5 Southern analiza DNA iz terenskih izolata CAV

Preparate CAV pripravili smo iz izolata CAV dobivenih iz pilića iz jata, u kojih se pojavila Marekova bolest u povećanom opsegu. Preparate DNA iz izolata CAV dobivenih od 12 tvrtki iz Nizozemske, neselektivno smo odabrali iz zbirke od 60 uzoraka. Samo iz jedne tvrtke su obavijestili o većoj smrtnosti zbog Marekove bolesti. Osim toga, jedan je izolat potjecao od biserke. Izolati CAV koje smo istražili, dobili smo ponajprije nakon što je veterinarska služba pri pregledu ustanovila atrofiju timusa.

S ciljem proučavanja stupnja sličnosti između klonirane CAV-DNA (pIC-20H/CAV-EcoRI) i DNA iz različitih terenskih izolata CAV, stanice MDCC-MSB1 zarazili smo izoliranom skupinom CAV. Izveli smo Southern analizu. Svi preparati DNA sadržavali su molekule DNA koje su specifično hibridizirale s kloniranim CAV-DNA obilježenim s ³²P. Molekule DNA različitih terenskih izolata CAV imaju duljine koje odgovaraju duljinama kloniranog CAV i dvolančane su ili jednolančane. Analizama sa Southern preslikom koje smo izveli izravno na uzorcima tkiva pilića s terena zaraženih s CAV, utvrdili smo da ti uzorci sadrže molekule DNA koje su hibridizirale s obilježenim pIC-20H/CAV-EcoRI.

20 Restriksijska enzimska analiza DNA iz terenskih izolata CAV

Sličnost DNA iz različitih terenskih izolata CAV s kloniranim genomom CAV dalje smo ispitali pomoću restriksijske enzimske analize. Preparate DNA iz izolata CAV i iz kloniranoga CAV odvojeno smo razrezali sa sedam restriksijskih enzima. Pokazalo se da su enzimi BamHI, BgII, SstI i XbaI razrezali sve deoksiribonukleinske kiseline identično. DNA iz većine terenskih izolata sadržavala je dva mjesta AccI i/ili dva mjesta HindIII, dok je DNA iz samo nekih izolata sadržavala mjesto EcoRI. Na slici 5 sažete su restriksijske enzimske mape kloniranoga CAV iz različitih terenskih izolata. Za svako mjesto restriksijskog enzima je u zagradama naveden broj terenskih izolata koji imaju relevantno mjesto.

30 Lančana reakcija s polimerazom (PCR) DNA iz terenskih izolata CAV

Sintetizirali smo oligonukleotide CAV-1 i CAV-2 (slika 4) izvedene iz klonirane sekvencije CAV-DNA. Za uporabu tih sintetskih oligonukleotida izveli smo PCR, da bismo specifično dokazali DNA iz terenskoga CAV. DNA izoliranu iz stanica MDCC-MSB1 zaraženih s različitim izolatima CAV, i DNA izoliranu iz nezaraženih stanica, umnožili smo. Nakon umnožavanja, DNA smo odvojili elektroforetski po duljini na gelu agar/etidijev bromid. U svim uzorcima DNA iz stanica zaraženih različitim izolatima CAV, bila je vidljiva umnožena mrlja s 186 bp (to je teorijski očekivana vrijednost). Ta specifična mrlja nije bila prisutna nakon umnožavanja DNA izolirane iz nezaraženih stanica. Mrlje umnožene DNA iz svih terenskih izolata pokazale su u agarском gelu identičnu brzinu putovanja. Ti rezultati znače, da u tome dijelu genoma različitih terenskih izolata CAV ne dolazi do većih delecija ili insercija. Southern analiza s oligonukleotidom CAV-3 obilježenim s ³²P (slika 4) pokazala je, da je umnožena DNA sa 186 bp specifična za CAV i da sa sondom Cav-3 nije hibridizirala nijedna druga mrlja DNA.

Ispitali smo osjetljivost otkrivanja CAV-PCR. DNA smo izolirali iz stanica zaraženih s CAV, postupno razrijedili, umnožili i analizirali na gelu agar/etidijev bromid. Nakon umnožavanja uzoraka, koji sadrže količinu DNA koja odgovara količini DNA u oko 100 stanica zaraženih s CAV, dokazali smo fragment DNA sa 186 bp, koji je specifičan za CAV. Kada smo s umnoženom DNA izveli Southern analizu CAV-3 DNA obilježene s ³²P, utvrdili smo, da ima još količina DNA, koja odgovara DNA iz 1 stanice, za posljedicu jasno vidljivu mrlju DNA specifične za CAV. PCR CAV je vrlo osjetljiva metoda otkrivanja koja je specifična za do sada ispitane izolate CAV.

50 Analiza kapljičnim nanosom ("dot blot") DNA iz terenskih izolata sa sondama CAV-DNA, obilježenima digoksinom

Osim PCR razvili smo test za otkrivanje DNA iz terenskih izolata CAV. Taj test ne upotrebljava radioaktivne sonde. Uključak CAV-DNA klona pIC-20H/CAV-EcoRI obilježili smo s 11-dUTP-digoksinom. Preparate DNA iz stanica MDCC-MSB1 koje smo odvojeno zarazili različitim izolatima CAV nanijeli smo na filter i analizirali glede njihove sposobnosti da hibridiziraju sa sondom DNA označenom digoksinom.

Preparati DNA iz stanica MDCC-MSB1 zaraženih različitim izolatima CAV, hibridizirali su sa sondom DNA obilježene digoksinom, dok DNA iz kulture nezaraženih stanica nije hibridizirala. Taj test koji upotrebljava neradioaktivno obilježenu sondu CAV DNA zato je prikladan za otkrivanje DNA iz terenskih izolata CAV.

Uporaba**DNA**

5 CAV sekvencije, na pr. plazmidne DNA pIC-20H/CAV-EcoRI, ili njezinih dijelova, možemo upotrijebiti za dokaz CAV-DNA i/ili -RNA u preparatima koje treba ispitati za istraživačke i dijagnostičke svrhe. DNA možemo obilježiti radioaktivno ili na drugi način, na pr. biotinom/digoksigeninom. Pomoću nanošenja u obliku mrlje (“slot blot”) DNA/RNA, Southern/Northern analize i hibridizacije in vitro možemo dokazati nazočnost nukleinskih kiselina CAV. Dijelovi sekvencija CAV koje tu upotrebljavamo, također su oligomeri DNA.

10 Oligomere izvedene iz sekvencije CAV klona pIC-20H/CAV-EcoRI možemo upotrijebiti u “lančanoj reakciji s polimerazom” (PCR), za otkrivanje vrlo niske koncentracije CAV DNA/RNA. PCR je vrlo osjetljiva metoda, koja se često upotrebljava za otkrivanje virusa.

15 U praksi su mogući dijagnostički kompleti koji se temelje na gornjoj uporabi.

Za istraživačke svrhe važne su tehnike, kao SI mapiranje i ekstenzija primjera s fragmentima CAV-DNA. Tim dvjema metodama može se CAV-RNA kvantificirati i dalje karakterizirati.

20 Za studij genskih funkcija mogu se upotrijebiti oligomeri u suprotnoj konfiguraciji. Mogu se upotrijebiti i kao model za studij novih metoda za sprječavanje razmnožavanja virusa.

CAV-DNA može se upotrijebiti kao nositelj u transfekciji manjih genskih fragmenata, osobito ako su u genomu CAV patogena svojstva uklonjena delecijom.

25 Oligomeri CAV u suprotnoj konfiguraciji mogu se izraziti u virusnim vektorima, čime je omogućeno proučavanje podvo-stručavanja CAV ili drugih genskih funkcija u živom biću ili in vitro.

RNA

30 Fragmenti CAV-DNA klonirani u vektore Sp6/T7 imaju za posljedicu produkte CAV-RNA. CAV-RNA dobiveni in vitro prepisivanjem, mogu se upotrijebiti za in vitro/in vivo sintezu proteina CAV. Time se mogu molekule RNA prevesti, na pr. u ekstraktu pčeničnih klica, u proteine (prevođenje in vitro). Proteini CAV, dobiveni prevođenjem in vitro, mogu se potom upotrijebiti na pr. za pronalaženje protutijela usmjerenih protiv CAV u pilića (vidi niže). Molekule CAV-RNA možemo umetnuti u stanice i mikroinjekcijom, da se u stanicama prevedu u proteine. Tako možemo proučavati učinke proteina CAV na razini stanice. Možemo analizirati međusobno djelovanje protein/protein i/ili Protein/DNA.

35 CAV RNA možemo upotrijebiti i kao sonde za pronalaženje nukleinskih kiselina CAV u preparatima. Analize možemo izvesti pomoću analize nanošenjem u obliku mrlje (“slot blot”), Southern, Northern i hibridizacije in situ. Te metode možemo upotrijebiti za razvijanje dijagnostičkih testova za CAV.

Proteini

45 Svi proteini CAV mogu se izraziti u prokariotičnim ili u eukariotičnim sustavima. Za to je potrebno ustanovljene otvorene okvire koji se čitaju CAV klonirati u prikladan vektor za izražavanje. Za bakterijski sustav je za izražavanje otvorenih okvira koji se čitaju CAV prikladan vektor koji se temelji na promotoru T7. Mogući eukariotični sustavi za izražavanje su sustav bakulovirusa, kvasac i sustav CHO-dhfr. U tu svrhu prikladni su i virusni vektori, kao retrovirusni vektori.

50 Proteine CAV ili epitope koji se nalaze na njima možemo upotrijebiti za otkrivanje protutijela usmjerenih protiv CAV. Tako možemo otkriti piliće zaražene s CAV. Proteine CAV ili epitope koji se nalaze na njima, možemo upotrijebiti u imunskim testovima, kao što je bojenje imunoperoksidazom, testovi ELISA i imunofluorescencijski testovi.

55 Proteine CAV ili epitope koji se nalaze na njima možemo upotrijebiti za osiguravanje humoralne i/ili na stanicu vezane imunosti protiv CAV. Proteine CAV dobivene izražavanjem u eukariotičnim ili prokariotičnim sustavima vektor/domaćin možemo upotrijebiti u vakcinama koje sadržavaju tu podjedinicu.

Pomoću proteina CAV ili epitopa koji se nalaze na njima možemo dobiti za CAV specifična protutijela, što omogućuje da osiguramo proteine CAV u preparatima pilića zaraženih s CAV (vidi niže).

60

Protutijela

U većini infekcijskih testova u mladih smo pilića potvrdili, da majčina protutijela mogu osigurati učinkovitu pasivnu zaštitu protiv zaraze CAV. Majčina protutijela su mladi pilići primili prirodnom putem, kao i preko injekcije ekstrakta žumanjka jajeta koje sadrži protutijelo protiv CAV, tek izleženom piliću. Pasivnu zaštitu protiv zaraze s CAV osigurali smo i pomoću ubrizgavanja ekstrakta žumanjka jajeta kokoši nesilica, koje su tik prije doba nesjenja zaražene s CAV.

Vakcinacija kokoši nesilica proteinima CAV izraženim u jednom od gornjih sustava za izražavanje, ima za posljedicu tvorbu majčinih protutijela. Mladi pilići tih kokoši nesilica biti će zaštićeni od zaraze s CAV.

Na temelju protutijela protiv CAV možemo razviti dijagnostičke testove. U tu svrhu možemo upotrijebiti kako poliklonska tako i monoklonska protutijela. Pomoću protutijela specifičnih za CAV možemo preparate ispitati na prisutnost proteina CAV.

Gornje uporabe protutijela protiv CAV moguće su za protutijela u skladu s pronalaskom, dobivena po ovdje opisanim postupcima, te za prirodna protutijela protiv CAV.

Žive virusne vakcine

Vjerojatno je, da opskrbljavanje imunog sustava virusnim proteinima pomoću vektora živoga virusa ima za posljedicu bolji imuni odaziv od vakcine koja obuhvaća tu podjedinicu. U vektore živoga virusa možemo klonirati jedan ili više već otvorenih okvira za čitanje CAV (u cijelosti ili dijelom). U peradi se može upotrijebiti samo vektore živoga virusa koji sami pokazuju dobro podvostručavanje u avianskom sustavu. Kao vektori za uporabu u pilića prikladni su na pr. kokošji poksvirus, vektori retrovirusa, vektori herpesvirusa (avianski herpesvirus, serotipi 1, 2 i 3) i virus zaraznoga laringotraheitisa, a možda i adenovirusi kao CELO. Imunizacija gornjim vektorima živoga virusa štiti pred CAV i virusom-nositeljem.

Uporabom jedne ili više delecija u genomu CAV možemo razviti vakcine koje imuniziraju protiv zaraza s CAV u mladih pilića. Ako upotrijebimo delecije, treba ukloniti patogeni značaj zaraze s CAV, ali treba sačuvati podvostručujuća i zato imunizacijska svojstva.

Također iz samoga genoma CAV možemo napraviti prikladan živi virusni vektor za izražavanje antigena drugih virusa. To zahtijeva da genom CAV promijenimo tako, da izražava osim ili umjesto proteina CAV, proteine "tuđega" virusa. Stoga možemo konstruirati takove vektore CAV, da dođe do zaštite samo protiv "tuđih" virusa ili i protiv CAV, što ovisi o izražavanju virusnih proteina sa strane rekombinantnog vektora u vakciniranih životinja.

Vakcine CAV, proizvedene kao vakcina koja obuhvaća tu podjedinicu, vakcina s delecijom ili genski fragment u vektoru drugoga virusa, uglavnom ćemo upotrebljavati za vakcinu kokoši nesilica. Ipak ostaje kao moguća uporaba izuma i vakcinacija pilića u mlađoj dobi, na pr. u kombinaciji s vakcinacijom protiv Marekove bolesti.

Poticajni/promotorski elementi

Promotorske i poticajne elemente CAV možemo klonirati u vektore DNA. Regulacijom promotora/poticatelja CAV možemo u pilećim stanicama i u stanicama druge vrste izraziti proteine CAV ili "tuđe" proteine.

Moguće je da promotor CAV djeluje u stanicama (pileće) koštane srži. Kao modelni sustav za gensku terapiju možemo "tuđe" proteine izraziti in vitro u stanicama koštane srži pomoću promotorskih/poticajnih elemenata CAV, u danom primjeru u kombinaciji s retrovirusnim vektorima. Genski modificirane stanice koštane srži se potom mogu presaditi u koštanu srž, u našem primjeru u koštanu srž pilića. Za vrlo male genske fragmente je za uporabu kao vektor prikladan i sam genom CAV.

Poticajni/promotorski elementi CAV mogu biti aktivni i u drugim organizmima. U tome primjeru se mogu elementi upotrijebiti na pr. u mišjem sustavu kao modelu za gensku terapiju.

Produkti CAV samoga, osiguravaju pod kontrolom našeg vlastitog promotora CAV ili drugoga promotora i mogućnosti za proučavanje i razvijanje tehnika za gensku terapiju.

Mogućnost uporabe sveukupnoga ili u biti sveukupnoga genoma CAV kao vektora za kloniranje, kao neke vrste eukariotičnoga plazmida za avianske sustave, je razvoj koji treba smatrati realnim glede otkrivene strukture genoma CAV.

Deponiranje klona pIC-20H/CAV-EcoRI CAV

Zaliha stanica HB101, transformiranih plazmidom pIC-20H/CAV-EcoRI, u glicerolu smo deponirali kod Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Nizozemska, 7. rujna 1990., pod brojem CBS 361.90.

5 **Opis slika**

Slika 1 prikazuje sekvenciju klonirane DNA CAV. Ukupna duljina je 2319 baza, pri čemu uzimamo prvo G mjesto EcoRI kao broj 1.

10 Slika 2 prikazuje predviđene otvorene okvire koji se čitaju (ORF) koji imaju za oba lanca DNA duljinu veću od 300 baza. Predviđeni okviri koji se čitaju (ORF) za tri različita početna kodona ATG, CTG i GTG prikazani su na 3 podslike 2A, 2B odnosno 2C.

Slika 3 prikazuje predviđene vlaknaste strukture genoma CAV, koji se sastoji od jednolančane DNA.

15 Slika 4 prikazuje oligonukleotide koje smo upotrijebili pri PCR. Prikazana je sekvencija DNA i položaj oligonukleotida na genomu CAV. Položaj oligonukleotida na genomu CAV slaže se s onim prikazanim na slici 1.

20 Slika 5 prikazuje restrikcijsku enzimsku mapu klonirane CAV-DNA. U zagradama je broj izolata CAV, od ukupnih 21 koji imaju relevantno mjesto restrikcijskoga enzima u genomu.

Materijali i metode

Stanične kulture i virusi

25 Izolate CAV uzgajali smo u linijama transformiranih limfoblastoidnih stanica iz tumora pilića, induciranih virusom avianske leukoze podskupine A (1104-X-5) ili virusom Marekove bolesti (MDCC-MSB1). Stanične kulture zarazili smo s oko 0.1-1 TCID₅₀ na stanicu. Nakon dva dana pokupili smo stanice. Stanice smo zarazili virusnim potomstvom klonirane CAV-DNA ili terenskim izolatima. CAV-Cux-1, koji je prvobitno izoliran u Njemačkoj iz jata pilića oboljelih od Marekove bolesti (Von Bülow et al., 1983, 1985), nabavio je dr. M.S. McNulty, Veterinary Research Laboratories, Belfast, Northern Ireland. U siječnju 1988 nam je dr. J.P. Rosenberger, University of Delaware, Newark, USA, poslao dva uzorka krvi za analizu virulentnosti nasada T-1704 Marekove bolesti i njegovoga derivata MDV-Del-S, koji je prva pasaža u pilića. Dobili smo izolate CAV-T-1704 i CAV-Del-S iz pilića SPF, zaraženih s nasadom T-1704 MDV i njegovim derivatom MDV-Del-S. Nizozemske izolate CAV neselektivno smo odabrali iz serije od šezdeset, koje smo sve uzgajali u kulturama stanica MDCC-MSB1. Terenski materijal je nabavio J.C. van den Wijngaard, Gezondheidsdienst Brabant, Boxtel, i J. Naber, Gezondheidsdienst voor Pluimvee, Doorn, ponajprije zato, jer su pri obdukciji utvrdili atrofiju timusa. Seriji smo dodali izolate CAV, dobivene iz naših vlastitih jata SPF.

Izolacija sveukupne DNA

40 Virusne i jetrene preparate ponovno smo suspendirali u 20 mM Tris HCl - pH 7.5, 2 mM EDTA, 0.2 % SDS, 0.6 mg/ml proteinaza-K i inkubirali 1 sat pri 37 °C. Preparate smo ekstrahirali s fenolom-kloroformom-izoamilnim alkoholom (25:24:1) i DNA istaložili etanolom. Pelete DNA smo ponovno suspendirali u 100 µl 10 mM Tris HCl - pH 7.5, 1 mM EDTA.

Ekstrakcija i analiza niskomolekulske DNA

45 Niskomolekulska DNA izolirali smo iz stanica 1104-X5 i MDCC-MSB1, zaraženih s CAV i nezaraženih stanica 1104-X5 u skladu s metodom koju je opisao Hirt (1967). DNA smo odijelili na agarским gelovima i nakon bojenja etidijevim bromidom izravno analizirali u UV svjetlosti, ili preslikali na filter Biotrace, u skladu s metodom koju je opisao Southern (1982). Preslike smo hibridizirali sa slučajno iniciranom DNA označenom s ³²P, izoliranom iz niskomolekulske DNA stanica 1104-X5, zaraženih s CAV, duljine 2.7-3.5 kb.

Kloniranje CAV-DNA

55 Sveukupni genom CAV-DNA klonirali smo u bakterijski vektor pIC-20H. Dijelove genoma CAV-DNA klonirali smo u vektor pIC-19R. Sve stupnjeve kloniranja plazmidne DNA izveli smo načelno u skladu s metodama koje su opisali Maniatis et al. (1982).

Analiza sekvencija CAV-DNA

60

Plazmide CAV-DNA očistili smo gradijentom CsCl i kromatografijom na Sephacryl-S500 (Pharmacia). U dvolančanoj DNA odredili smo sekvencije pomoću T₇ DNA polimeraze (Pharmacia) ili Taq DNA polimeraze (Promega). Objekte metode izveli smo prema navodima koje su dali Pharmacia ili Promega. Oligonukleotide smo obradili ("kinirali") s T₄ nukleotid kinazom tvrtke Pharmacia. Na mjestima gdje je određivanje sekvencija teško ("strong stops"), odredili smo sekvencije u skladu s metodom koju su opisali Maxam i Gilbert (1977).

Zakretanje kloniranoga genoma CAV-DNA u prsten

10 10 µg plazmida DNA klona, koji sadrže sveukupan genom CAV-DNA, razgradili smo restrikcijskim enzimom tako, da smo sveukupni uključak CAV-DNA odvojili od vektora DNA. Obradba 2.3 kilobaznih parova molekule linearne CAV-DNA s T₄-DNA ligazom imala je za posljedicu prstenastu dvolančanu CAV-DNA. Produkte vezanja analizirali smo na 0.8 %-tnom agarском gelu.

15 Transfekcija s DEAE-dekstranom

Za transfekciju stanica 1104-X5 i MDCC-MSB1 suspendirali smo 2 µg ponovno vezane CAV-DNA dva puta u 25 µl Milli-Q vode i pomiješali s 260 µl pufera TBS. Smjese DNA dodali smo 15 µl 10 mg/ml DEAE-dekstrana i smjesu inkubirali 30 minuta pri sobnoj temperaturi.

20 **Stanice 1104-X5.** 50 mm-sku ploču za tkivnu kulturu s 1-2x10⁶ stanica 1104-X5/ploči isprali smo dva puta puferom TBS. Pufer TBS potpuno smo uklonili s jednostaničnoga sloja i dodali 300 µl razrijeđene DEAE-dekstran/DNA. Stanice smo inkubirali 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Smjesu DEAE-dekstran/DNA nadomjestili smo s 2 ml 25 %-tnoga DMSO/TBS i jednostanični sloj inkubirali 2 minute pri sobnoj temperaturi. Stanice smo isprali dva puta puferom TBS i potom dodali medij za tkivnu kulturu (RPMI1640 ili E-MEM). Stanice smo inkubirali pri 37 °C - 5 % CO₂.

30 **Stanice MDCC-MSB1.** U stolnoj centrifugi smo centrifugirali pri 1500 okretaja/minuti oko 2x10⁶ stanica MDCC-MSB1. Medij smo nadomjestili s 5 ml pufera TBS i stanice oprezno ponovno suspendirali. Stupanj ispiranja smo ponovili. Ukonili smo sav pufer TBS, staničnu peletu oprezno ponovno suspendirali u 300 ml smjese DEAE-dekstran/DNA i inkubirali pri sobnoj temperaturi 30 minuta. Dodali smo 0.5 ml 25 %-tnoga DMSO/TBS i suspenziju inkubirali 3 minute pri sobnoj temperaturi. Dodali smo 5 ml TBS i stanice centrifugirali u stolnoj centrifugi pri 1500 okretaja/minuti. Supernatant smo ukonili i dodali 50 ml medija za tkivnu kulturu. Stanice smo ponovno suspendirali i centrifugirali. Stanice smo stavili u 5 ml medija za tkivnu kulturu i inkubirali pro 37 °C - 5 % CO₂. Za kontrolu smo upotrijebili za transfekciju 2 µg plazmida pIC-20H.

35 Test neutralizacije in vitro

40 Stanice MDCC-MSB1 zarazili smo supernatantom stanica MDCC-MSB1 i stanice 1104-X5 transfektirali kloniranom "CAV-DNA". Zarazili smo oko 2x10⁴ stanica. Sadržaj virusa u tome inokulumu nije bio točno poznat. U polovici zaraženih staničnih kultura, dodali smo mediju poliklonski serum s neutraliziranom aktivnošću, usmjerenom protiv CAV, razrijeđen 1:100. Za kontrolu smo uzeli seriju rupica sa stanicama MSB1 zaraženim sa CAV, pri čemu mediju nismo dodali antiserum usmjeren protiv CAV.

45 Zaraza jednodnevnih pilića s CAV

50 Supernatante stanica MDCC-MSB1 i 1104-X5, transfektiranih s CAV-DNA i kontrolu DNA, ubrizgali smo intramuskularno jednodnevnim pilićima. Šest dana nakon zaraze učinili smo obdukciju po 5 pilića iz svake skupine, nakon što smo najprije odredili vrijednost hematokrita i ukupnu tjelesnu masu. Za izolaciju virusa i imunohistokemiju odabrali smo hepariniziranu krv, timus i koštano srž. Imunohistokemijske pretrge su se obavile pomoću peroksidaznoga bojenja reznjeva timusa sa, između ostaloga, za CAV specifičnim monoklonskim CV1-85.1. Četnaest i dvadeset-osam dana nakon zaraze učinili smo obdukciju još 5 pilića i izveli sva gornja određivanja.

Lančana reakcija s polimerazom (PCR)

55 Oligonukleotide smo sintetizirali pomoću priprave Cyclone DNA synthesizer (Biosearch Inc. USA). Sekvenciju smo izveli iz sekvencije CAV-DNA, prikazane na slici 1. PCR smo izolirali na DNA iz stanica MDCC-MSB1 zaraženih s CAV, te iz nezaraženih stanica MDCC-MSB1. Konačna koncentracija reagenasa bila je 50mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 3 mM MgCl₂, 0.01 % albumina iz telećeg seruma, po 200 µM oligonukleotida i 2 jedinice Tag-DNA polimeraze (CETUS, USA) u ukupno 100 µl. Uzorke DNA ciklično smo inkubirali 30 puta pri 93 °C po 1 minutu, pri 55 °C po 1 minutu i pri 72 °C po 3 minute u programiranome termostatu Perkin Elmer/Cetus thermal cycler. Jednu

desetinu umnožene DNA smo izravno analizirali na 2 %-tnom gelu agar/etidijev bromid, ili analizom sa Southern preslikom. Sonda DNA koju smo upotrijebili, bila je oligonukleotid, koji je bio terminalno obilježen s ³²P u skladu s Maniatisom et al. (1982).

5 **Analiza kapljičnim nanosom**

Izolirali smo uključak CAV-DNA u pIC-20H/CAV-EcoRI i obilježili ga s digoksigenin-11-dUTP (Boehringer, Mannheim, Njemačka) u skladu s pravilnikom dobavitelja. Filtre Biotrace-RP zasitili smo s 1.5 M NaCl i 0.15 M Na citratom. Uzorke DNA smo ponovno suspendirali u 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) i 1 mM EDTA, kuhali 3 minute, ohladili na ledu i položili na filter. Filter smo osušili pri sobnoj temperaturi i inkubirali 30 minuta pri 65 °C. Filtre smo hibridizirali s DNA, obilježenom s digoksigeninom. DNA, označenu digoksigeninom učinili smo vidljivom pomoću imunološkog bojenja u skladu s pravilnikom dobavitelja.

Tablica 1: Poznati elementi sekvencije za vezivanje faktora prepisivanja u području poticatelja/promotora virusa CAV.

element	konzensusna sekvencija	sekvencija CAV	položaj u sekvenciji CAV
1.	-TATA-#	GTATA ^A /TA ^A /T	GTATATAT 321-330+
2.	SP1	GGGCGG	GGGCGG 305-310+
3.	CREB	TGACGTCA	TGACGTTT 290-297
4.	PEA-I (Py)	GGAAGT <u>GACTA</u> AC	GAAAGT <u>GACTT</u> TC 286-298
5.	GT (SV40)	G ^G /C <u>TGTGGAA</u> ^A /TGT	CGTTGCGAAAGT 279-290
6.	MLTF	GGCCACGTGACC	TGCCACTGTCGA 274-285
7.	CCAAT-TF	AGCCAAT	AGCCAAT 260-266+
8.	-CACCC-#	CACCC	CAGCC 259-263
9.	ATF	ACGTCA	ACGTCA 253-258+
10.	-CACCC-#	CACCC	CAGCC 236-240
11.	ATF	ACGTCA	ACGTCA 232-237+
12.	SP1 (Šibek)		GAGGCG 209-214
13.	ATF	ACGTCA	ACGTCA 199-204+
14.	-CACCC-#	CACCC	CATCC 182-186
15.	ATF	ACGTCA	ACGTCA 178-183+
16.	-CACCC-#	CACCC	CATCC 161-165
17.	ATF	ACGTCA	ACGTCA 157-162+

- mjesto CAP je vjerojatno pri oko 350
+ potpuna homolognost između sekvencije CAV i konsenzusne sekvencije
konsenzusna sekvencija, utvrđena u većine virusa sekvencija DNA elementa

Literaturni izvori

1. De Boer, G.F., Pol, J.M.A., and Jeurissen, S.H.M. (1988). Marek's disease vaccination strategies using vaccines made from three avian herpesvirus serotypes. Proceedings First International Poultry and Poultry Diseases Symposium, Manisa, Turkey, str. 34-48 (v turščini, angleški povzetek).
2. De Boer, G.F., Jeurissen, S.H.M., Van Roozelaar, D.J., Vos, G.J., and Koch, G. (1989a). Enhancing effects of chicken anaemia agent (CAA) on Marek's disease pathogenesis. Proceedings of the Thirty-eighth Western Poultry Disease Conference, Tempe, Arizona, U.S.A, str. 28.
3. De Boer, G.F., Pol, J.M.A., and Jeurissen, S.H.M. (1989b). Enhancing effects of chicken anaemia agent (CAA) on Marek's disease pathogenesis. Abstractbook IXth Intern. Congress of the WVPA, Brighton, U.K., str. 74.
4. Engström, B.E. (1988). Blue wing disease of chickens: Isolation of avian reovirus and chicken anaemia agent. *Avian Pathology* 17, 23-32.
5. Engström, B.E., Fossum, O., and Luthman, M. (1988). Blue wing disease of chickens: Experimental infection with a Swedish isolate of Chicken Anaemia Agent and an avian Reovirus. *Avian Pathology* 17, 33-50.
6. Hann, S.R., King, M.W., Bentley, D.L., Anderson, C.W., and Eisenman, R.N. (1988). A non-AUG translational initiation in c-myc exon 1 generates an N-terminally distinct protein whose synthesis is disrupted in Burkitt's lymphomas. *Cell* 52, 185-195.
7. Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from injected mouse cell cultures. *Journal of Molecular Biology* 26, 365-369.
8. Jeurissen, S.H.M., Pol, J.M.A., De Boer, G.F. (1989). Transient depletion of cortical thymocytes induced by chicken anaemia agent. *Thymus* 14, 115-123.

9. Jones, N. (1990). Structure and function of transcription factors. *Seminars in Cancer Biology* 1, 5-19.
10. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
11. Maxam, A.M., and Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings National Academic Sciences U.S.A.* 74, 560-564.
12. McNulty, M.S., Connor, T.J., McNeilly, F., McLoughlin, M.F., and Kirkpatrick, K.S. (1990). Preliminary characterisation of isolates of chicken anaemia agent from the United Kingdom. *Avian Pathology*, In Press.
13. Ritchie, B.W., Niagro, F.D., Lukert, Steffens, W.L., and Latimer, S. (1989). Characterization of a new virus from cockatoos with psittacine beak and feather disease. *Virology* 171, 83-88.
14. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulsen, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings National Academic Sciences U.S.A.* 74, 5463-5467.
15. Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98, 503-517.
16. Tischer, I., Gelderblom, H., Vetterman, W., and Koch, M.A. (1982). A very small porcine virus with circular, singlestranded DNA. *Nature* 295, 64-66.
17. Todd, D., Creelan, J.L., Mackie, D.P., Rixon, F., and McNulty, M.S. (1990). Purification and biochemical characterisation of chicken anaemia agent. *Journal of General Virology* 71, 819-823.
18. Vielitz, E. (1989). Protect your chicks from infectious anemia. *Poultry Science* 68, 34-35.

19. Von Bülow, V., Fuchs, B., Vielitz, B., and Landgraf, H. (1983). Frusterblichkeitssyndrom bei Küken nach Doppelinfektion mit dem Virus des Marekschen Krankheit (MDV) und eine Anämie-Erreger (CAA). Zentralblatt für Veterinarmedizin B. 30, 742-750.
20. Von Bülow, V., Fuchs, B., and Bertram, M. (1985). Untersuchungen über den Erreger der Infectiosen Anämie-Erreger bei Hühnerküken (CAA) in vitro: Vermehrung, Titration, Serumneutralisationstest und indirekter Immunofluoreszenztest. Zentralblatt für Veterinarmedizin B. 32, 679-693.
21. Yuasa, N., Taniguchi, T., and Yoshida, I. (1979). Isolation and some properties of an agent inducing anaemia in chicks. Avian Diseases 23, 366-385.
22. Yuasa, N., Taniguchi, T., and Yoshida, I. (1980). Effect of infectious bursal disease virus infection on incidence of anaemia by chicken anaemia agent. Avian Diseases 24, 202-209.
23. Yuasa, N. (1983). Propagation and infectivity titration of the Gifu-1 strain of chicken anaemia agent in a cell line (MDCC-SB1) derived from Marek's disease lymphoma. National Institute of Animal Health Quarterly 23, 13-20.

PATENTNI ZAHTEJEVI

5

1. Rekombinantna genska informacija u obliku obilježene ili neobilježene DNA ili RNA, **naznačena time**, da obuhvaća nukleotidnu sekvenciju, specifičnu za virus piliće anemije (CAV), koja se slaže ili je komplementarna nukleotidnoj sekvenciji genoma CAV ili njegovoga dijela.
2. Rekombinantna genska informacija prema zahtjevu 1, **naznačena time**, da obuhvaća nukleotidnu sekvenciju specifičnu za CAV, koja se slaže ili je komplementarna nukleotidnoj sekvenciji prikazanoj na slici 1, nukleotidnu sekvenciju koja je s njom najmanje 60 % homologna, ili njezin dio.
3. Rekombinantna genska informacija prema zahtjevu 1 ili 2, **naznačena time**, da obuhvaća nukleotidnu sekvenciju specifičnu za CAV, koja se slaže ili je komplementarna nukleotidnoj sekvenciji, koja kodira protein CAV, koji se pojavljuje u genomu CAV, ili njegov dio.
4. Rekombinantna genska informacija prema zahtjevu 1 ili 2, **naznačena time**, da obuhvaća nukleotidnu sekvenciju specifičnu za CAV, koja se slaže ili je komplementarna nukleotidnoj sekvenciji, koja ima regulacijsku funkciju, koja se pojavljuje u genomu CAV, ili njezin dio.
5. Rekombinantna genska informacija prema bilo kojemu od ranijih zahtjeva, **naznačena time**, da obuhvaća nukleotidnu sekvenciju koja nije izvedena iz genoma CAV.
6. Rekombinantna genska informacija prema zahtjevu 5, **naznačena time**, da obuhvaća nukleotidnu sekvenciju koja nije izvedena iz genoma CAV, nukleotidnu sekvenciju izvedenu iz prokariotičnog ili eukariotičnog vektora za izražavanje.
7. Rekombinantna genska informacija prema zahtjevu 5, **naznačena time**, da obuhvaća nukleotidnu sekvenciju koja nije izvedena iz genoma CAV, nukleotidnu sekvenciju koja kodira protein različit od proteina CAV, ili nukleotidnu sekvenciju koja kodira dio takovoga različitog proteina.
8. Rekombinantna genska informacija prema zahtjevu 5, **naznačena time**, da obuhvaća nukleotidnu sekvenciju koja nije izvedena iz genoma CAV, nukleotidnu sekvenciju koja se ne pojavljuje u genomu CAV i koja ima regulacijsku funkciju.
9. Rekombinantna genska informacija prema bilo kojemu od prijašnjih zahtjeva, **naznačena time**, da je u obliku DNA.
10. Rekombinantna genska informacija prema zahtjevu 9, **naznačena time**, da je DNA obilježena jednim ili više markera, prikladnih za obilježavanje DNA, kao što su radioizotopi, enzimske molekule, hapteni, fluorescencijske tvari, bojila, pigmenti i markeri u obliku čestica.
11. Rekombinantna genska informacija prema bilo kojemu od prijašnjih zahtjeva, **naznačena time**, da je u obliku RNA.

35

12. Rekombinantna genska informacija prema zahtjevu 9, **naznačena time**, da je RNA obilježena jednim ili više markera, prikladnih za obilježavanje RNA, kao što su radioizotopi, enzimske molekule, hapteni, fluorescencijske tvari, bojila, pigmenti i markeri u obliku čestica.
13. Rekombinantna genska informacija prema bilo kojemu od prijašnjih zahtjeva, **naznačena time**, da je sadržana u česticama rekombinantnog virusa.
14. Uporaba rekombinantne genske informacije prema bilo kojemu od prijašnjih zahtjeva, **naznačena time**, da služi za dijagnostičke svrhe, za svrhe imunizacije ili vakcnacije ili za pripravu proteina CAV ili proteina koji nisu proteini CAV.
15. Uporaba rekombinantne genske informacije prema bilo kojemu od zahtjeva 1 do 12, **naznačena time**, da služi kao sonda ili primjer, koji su specifični za CAV, u postupku za otkrivanje CAV-DNA ili -RNA, na pr. u postupku nanošenja DNA/RNA u obliku mrlje ("DNA/RNA slot blotting"), preslika po Southernu ("Southern blotting"), preslika po Northernu ("Northern blotting"), hibridizacije in situ, umnažanja DNA s PCR, S1-mapiranja i ekstenzije primjera.
16. Dijagnostički komplet prema bilo kojemu od zahtjeva 1 do 12, **naznačen time**, da služi za otkrivanje CAV-DNA ili -RNA u postupku, kao što je nanošenja DNA/RNA u obliku mrlje ("DNA/RNA slot blotting"), preslika po Southernu ("Southern blotting"), preslika po Northernu ("Northern blotting"), hibridizacije in situ, umnažanja DNA s PCR, S1-mapiranja ili ekstenzije primjera, pri čemu taj dijagnostički komplet sadrži rekombinantnu gensku informaciju kao sondu ili primjer koji su specifični za CAV.
17. Uporaba rekombinantne genske informacije prema zahtjevu 13, **naznačena time**, da je kao živa virusna vakcina za zaštitu protiv CAV ili drugoga patogenog uzročnika.
18. Vakcinski pripravak za imunizaciju protiv CAV ili drugoga patogenog uzročnika, **naznačen time**, da sadrži rekombinantnu gensku informaciju prema zahtjevima 1 do 13 i u danom primjeru jedan ili više nositelja i adjuvansa, prikladnih za žive virusne vakcine.
19. Uporaba rekombinantne genske informacije prema bilo kojemu od zahtjeva od 1 do 13, **naznačena time**, da je u postupku za pripravu proteina CAV, njegovoga dijela, ili proteina koji je drugačiji od proteina CAV, s prevođenjem in vitro ili in vivo.
20. Uporaba rekombinantne genske informacije prema bilo kojemu od zahtjeva od 1 do 13, **naznačena time**, da je kao vektora za kloniranje za avianske sustave.
21. Prokariotična ili eukariotična stanica, **naznačena time**, da sadrži rekombinantnu gensku informaciju prema bilo kojemu od zahtjeva 1 do 13.
22. Prokariotična ili eukariotična stanica, koja sadrži rekombinantnu gensku informaciju prema bilo kojemu od zahtjeva 1 do 13, **naznačena time**, da je sposobna izraziti svaki pojedinačni protein ili dio proteina, koji kodira ta rekombinantna genska informacija.
23. Protein CAV ili njegov dio dobiven in vitro prevođenjem rekombinantne genske informacije prema bilo kojemu od zahtjeva 1 do 13, **naznačen time**, da obuhvaća nukleotidnu sekvenciju koja kodira protein CAV ili njegov dio.
24. Protein CAV ili njegov dio dobiven izolacijom iz prokariotične ili eukariotične stanice koja sadrži rekombinantnu gensku informaciju prema bilo kojemu od zahtjeva 1 do 13, **naznačen time**, da obuhvaća nukleotidnu sekvenciju koja kodira protein CAV ili njegov dio, i koja ga je sposobna izraziti.
25. Uporaba proteina CAV ili dijela proteina prema zahtjevu 23 ili 24, **naznačena time**, da je za dijagnostičke svrhe ili za svrhe imunizacije ili vakcinacije, ili za pripravu protutijela specifičnih za CAV.
26. Uporaba proteina CAV ili dijela proteina prema zahtjevu 23 ili 24, **naznačena time**, da služi kao reagens koji veže protutijela specifična za CAV, u postupku imunskoga testa za otkrivanje protutijela specifičnih za CAV, na pr. bojenju s imunoperoksi-dazom, testu ELISA ili imunofluorescencijskom testu.
27. Dijagnostički komplet **naznačen time**, da je za otkrivanje protutijela specifičnih za CAV, u postupku imunskoga testa, kao bojenju s imunoperoxidazom, testu ELISA ili imuno-fluorescencijskom testu, pri čemu sadrži taj dijagnostički komplet protein CAV ili dio proteina CAV prema zahtjevu 23 ili 24, kao reagens koji veže protutijela specifična za CAV.
28. Uporaba proteina CAV ili dijela proteina prema zahtjevu 23 ili 24, **naznačena time**, da služi kao vakcina koja sadrži tu podjedinicu za zaštitu protiv CAV.
29. Vakcinski pripravak za imuniziranje protiv CAV, **naznačen time**, da taj pripravak sadrži protein CAV ili dio proteina CAV prema zahtjevu 23 ili 24 i u danom primjeru jedan ili više nositelja i adjuvansa, prikladnih za vakcine koje sadrže tu podjedinicu.
30. Uporaba proteina CAV ili dijela proteina prema zahtjevu 23 ili 24, **naznačena time**, da služi u postupku za pripravu poliklonskih ili monoklonskih protutijela specifičnih za CAV.
31. Protutijela specifična za CAV, **naznačena time**, da su pripravljena pomoću proteina CAV ili njegovoga dijela, prema zahtjevu 23 ili 24.
32. Uporaba protutijela specifičnih za CAV, prema zahtjevu 31, **naznačena time**, da služi za dijagnostičke svrhe, svrhe imunizacije ili vakcinacije, ili za preparativne svrhe.
33. Uporaba protutijela specifičnih za CAV, prema zahtjevu 31, **naznačena time**, da služi kao reagens koji veže protein CAV u postupku imunskoga teasta za dokazivanje proteina CAV.

34. Dijagnostički komplet **naznačen time**, da je za dokaz proteina CAV u postupku imunskoga testa, pri čemu sadrži taj dijagnostički komplet kao reagens za vezivanje proteina CAV protutijela prema zahtjevu 30, specifična za CAV.
- 5 35. Uporaba protutijela specifičnih za CAV, prema zahtjevu 31, **naznačena time**, da služi za pasivnu imunizaciju protiv zaraze s CAV.
36. Imunizacijski pripravak za pasivnu imunizaciju protiv CAV, **naznačen time**, da sadrži protutijela prema zahtjevu 31, specifična za CAV, i u danom primjeru jedan ili više nositelja i adjuvansa prikladnih za pasivnu imunizaciju.
- 10 37. Uporaba protutijela specifičnih za CAV, prema zahtjevu 31, **naznačena time**, da služi u postupku za izoliranje i/ili čišćenja proteina CAV.

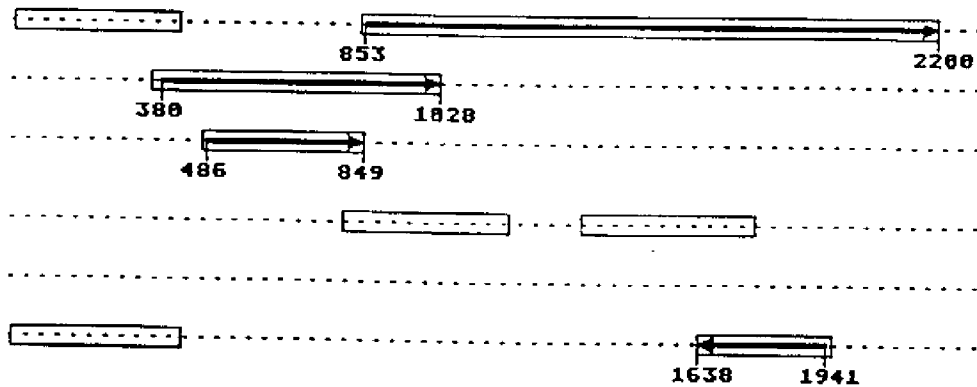
SAŽETAK

15 Rekombinantna genska informacija (DNA ili RNA) koji obuhvaća nukleotidnu sekvenciju, specifičnu za virus pileće anemije (CAV), i njezina uporaba za dijagnostiku, vakcinaciju ili proizvodnju proteina. Rekombinantni protein CAV i njegova uporaba za dijagnostiku, vakcinaciju ili produkciju protutijela specifičnih za CAV. Uporaba tako dobivenih protutijela specifičnih za CAV.

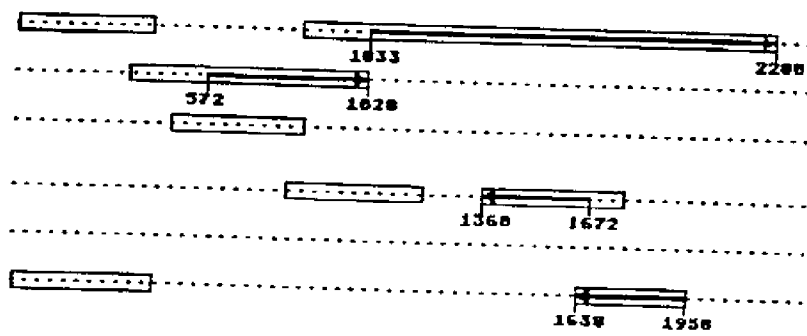
CRTEŽI

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GAATTCGGAG TCGTTACTAT TCGATCAGCA TTCTAGCCCTG TACACAGAAA GTCAAGATGG ACCAATCCCT CCACTTCGCT CGCGATTCCG CGAAGCCGGC
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 CGGCGCGAGG CCGCCCGGTC CCCCCCCTCC AACCACTGGA GCACGTACAG GCGGCTAGCT CATECGTACA CCGGGCTTAG TCATCCCTAC ACCCGGGGTAC
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 GTACAAAGA GCGCTTCCCG TACAGGGGG TACGTACCG GTACAGGGG GTACGTACA GCCAATCAA AGCTCCGACG TTCCGAAAGT CACGTTTCCA
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 AAATGGCGG CGCAAGCCTC TCTATATATT CAGCGCACAT ACCGGTCCGC AGTAGGTATA CCCAAGCCCG TCCCGGTCCA TGCACGGGAA CCGCCGACAA
 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 CCGCCCGCTG GCGGCAGTCA ATCGGGCCTT ACCCCAGAGG GGCAACTCG GCCCAGCCA CCGCGCAGG GCGCAAGTAAT TTCAAATCAA CGCTCTCCAA
 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 GAAGTACTC CACCGGACC ATCAACGGTG TTCAGGCCAC CAACAAGTTC ACCGCCCTTG GAAACCCCTC ACTGCAGAGA CATECCGATT CGTATCCCTG
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 GAATTACAAT CACTCTATCG CTGTGTGGT CCGCGAATGC TCCCGCTCC ACCCTAAGAT CTGCAACTGC GCACAATTCA CAAGCCACTG GTTTCAGCAA
 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 TGTCCCGGAC TTCAGGACCG ATCAACCCAA GCCTCCCTCG ACAAGGGAT CCTCCGACCC CTCGGAGTAC AGCCTAAAGC AGCTAAAAGA AAGCTTCATT
 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 ACCACTACTC CCAGCCGACC CCGAACCCTA AAAAAAGCCTA TAAGACTGTA AGATGGCAAG ACCAGCTCCG AGAECGAGAG CCGGATTTTA CTCCTTCAGA
 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 AGAGGACCGT GGCACCACTT CAAGCGACTT CCAGCAAGAT ATAAATTCC ACATCCGAGG AGACACCGGT ATCTGTAGCC ACCTTTTAGE AAGGCCCTTC
 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 ACAACCCCG CCGCGGTAGG TATAGTGTGA GCCTCCCGAA CCGCAATCT ACTATGACTA TCCCGTCCA ACGGGTCAIC TTTCTCAGC AAGCACTCAT
 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 TCTCCCTAAA AACAGCACAG CCGGGGCTA TCGAGACCAC ATGTACGGGG CCAGAGTCCC CAAGATCTCT GTCAACCTGA AACAGTTCCT CCTAGCCCTCA

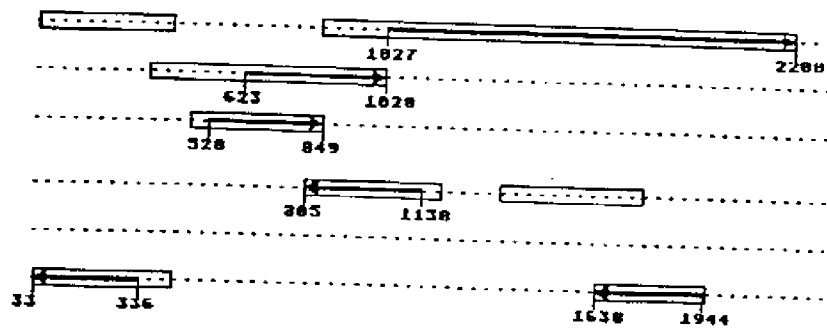
1210 ATCAACTGA 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 CATACTGAG CAAATCGA GGGCCCATCG CCGTGAGT CATTGCCGAC GCGTCTAAT CACAAGCCGC GGACAATGG CCTAATTCCT
 1310 GCGTGGCCT 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 AGATAATAAC GTGCCCTCCG CTACACCATE GGCATGCTCG AGATGGCCCT TAATGATCAT GCAGCCGACC GACTCTTGCC CGTTCCTTAA
 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 TCACCCAAAG CACATGACCC TGCAMGACAT GCGTGGCATG TTTCGGCGCT GGCACCTGTT CCGACACATT GAAACCCGCT TTCAGCTCCT TCCCACTAAG
 1510 AATGACCGAT CCTTCAGCCC CGTCGGGAGT CTTCCTCTCC AGGAGAGTA CCTCAGCGCT CCGGACGATG TTAAGTACAG CAGCCATCAC CACAACCCGT
 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
 GCGAAAAGG CCGACAACCG ATGACGGGG GCAATTCCTA TCCGACGGG AAAATCAGAC CCGACGAGCA ACAGTACCCT GCTATGCCCC CAGACCCCCC
 1710 GATCATACC CCTACTACAG CCGAAGCCAC GCAAGTCCCC TGCATGAATA GCACCCAAAC TTCTCGCTCA TCCGACACAT ATATCAGCTT TCGAAGACTC
 1810 ACACCACTCG GTGCACAATC GTCTTTTCCT CCAGCGCAAC GTTCAGTTTC TAGACGGTCC TTCAAACCACC ACAAGGCCGAG AGGAGCCCGG CACCCCAAGC
 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
 CCCAGAGATG GCACACGCTC GTGCCGCTCC CCACGGAGAC CATCACCCGAC AGCTACATCT CAGCACCCGC ATCAGAGCTG GACACTAATT TCTTTACGCT
 2010 TTACGTAGCG CAAGGCACAA ATAAGTCCCA ACAGTACAAG TTCGCCACAG CTACATACCC GCTAAAGGAG CCGGTAATCA AGAGCGATCC ATGCCGACTG
 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200
 GTACCGCTCC AGTCGGTCTG GCACCTGGGT AACAGGCACA GGGCATACCC ATCGGACCTC AACTGGGGGA ACAGCACCAT GTACTGGCGG ACCGACCCCT
 2210 GAAAAGGGG CCGCGCTAAA GCGCCGCCCC CTTAAACCCC CCCCCTGGGG GCATTCGCCG CCGACACCCC CCTTTATATA GCACTCAATA AACGCAGAAA
 2310 ATAGATTAT CCGCACTATC



SLIKA 2a



SLIKA 2b



SLIKA 2c

```

      A A
      T A
      G C
      G C
      G C
      G C
      G C
      G C
      G C
      G C
      G C
      G C
      G C
      G C
      G C
      A T A A
      A T A C C C C C C C
      | A G G G G G G G T
      A T
      A T
      G C
      G C C T |
      A C G C A |
      G C
      G C
      G C
      G C
      G C
      T A
      C G
      A |
      T A
      G C
2180      2266

```

SLIKA 3a

```

      T T
      C   C
      A   G
      G C
      C   T
      T   C
      C G
      G C
      C G
      T A
      A T
      A T
      G C
      C G
      A T
      G C
      G   G
      T A
59      93

```

SLIKA 3b

```

      C C
      C   C
      G   C
      G   C
      A   G
      G   G
      G T
      C G
      C G
      G C
      G C
      G C
      G C
      G C
      G C
      C   T
      G C
      G C
      A   A
      A   A
      G C
      C G
      T A
90      135

```

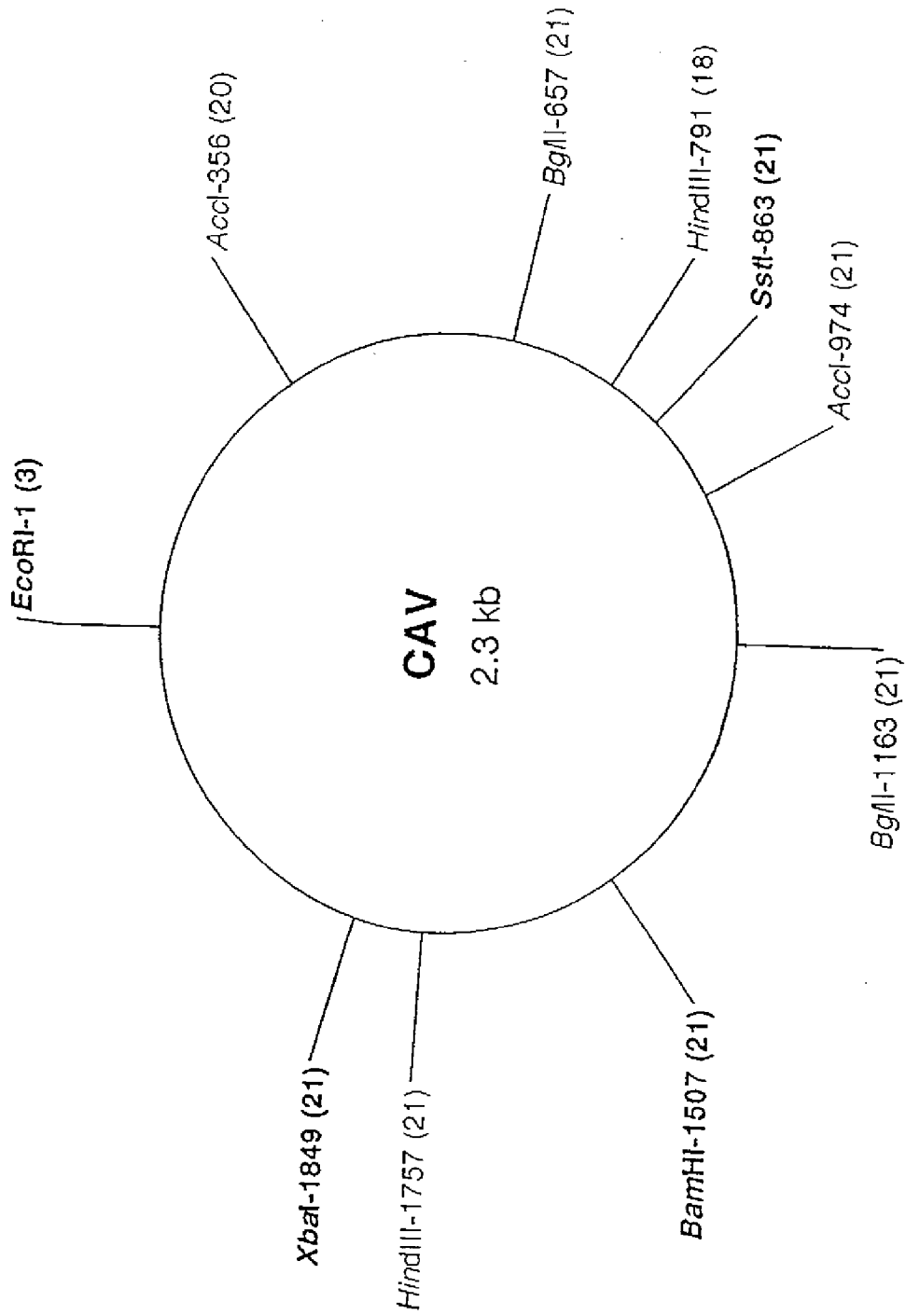
SLIKA 3c

360 ACCGGTCGGCAGTAGGTAATACGCRAAGCGGTCCGGGTGGATGCACGGGAACGGCCGACACCCGGCCGCTG
CAV-1 ---> 380 400

430 GGGCAGTGAATCGGCGCTTAGCCGAGAGGGCAACCTGGGCCAGCGGAGCCGGCAGGGCAAGTAAT
CAV-3 ---> 450 470

500 TTCAAATGAACGCTCTCCAAGAAGATACTCCACCCGGACCATCAACGGTGTTCAGGCCACCAACAAGTTC
<--- CAV-2 520 540

SLIKA 4



SLIKA 5