



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

221 881 B1

(21) A bejelentés ügyszáma: P 96 02311
(22) A bejelentés napja: 1995. 11. 22.
(30) Elsőbbségi adatok:
08/344 227 1994. 11. 23. US
08/404 731 1995. 03. 15. US
08/503 226 1995. 07. 27. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 95/16039
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 96/16172

(51) Int. Cl.⁷

C 12 N 15/12

C 07 K 14/47

G 01 N 33/68

C 12 N 15/54

C 12 N 15/55

C 12 N 9/12

C 12 N 9/10

C 07 K 1/113

C 07 K 7/06

C 07 K 7/08

C 12 Q 1/42

C 12 Q 1/48

(40) A közzététel napja: 1997. 05. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2003. 02. 28.

(72) Feltalálók:

Coghlan, Vincent M., Portland, Oregon (US)
Gallatin, William M., Mercer Island, Washington (US)
Howard, Monique L., Seattle, Washington (US)
Lockerbie, Robert Owen, Kirkland, Washington (US)
Scott, John D., Portland, Oregon (US)

(73) Szabadalmazók:

ICOS Corporation, Bothell, Washington (US)
Oregon Health Sciences University, Portland, Oregon (US)

(74) Képvisező:

Parragh Gáborné dr., S. B. G. & K. Szabadalmi
Ügyvivői Iroda, Budapest

(54)

Kötőprotein funkció modulátorok, eljárás előállításukra és alkalmazásuk

KIVONAT

A találmány tárgyát a kalcineurin anyagcsere szabályozása és az interleukin-2 T-sejtek által való expressziójának befolyásolása, a sejtek bizonyos peptidokkal való kezelése révén, képezi.

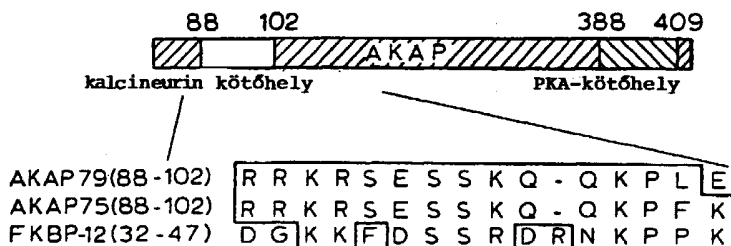
Ugyancsak a találmány tárgyát képezi egy kalcineurint kötő peptid – amely adott esetben megköti a PKA-t és az Arg-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Ser-Ser-Lys-Glu-Glu-Lys-Pro,

Arg-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Ser-Ser-Lys-Glu-Glu-Lys-Pro-Leu-Gln

vagy az

Arg-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Ser-Ser-Lys-Glu-Glu-Lys-Pro-Phe-Lys

aminosavszekvenciát tartalmazza – és ennek alkalmazása olyan gyógyszer előállítására, amely a kalcineurinaktivitást gátolja egy sejtben, a sejtnek a kalcineurint kötő peptiddel való érintkezése során.



1A. ábra

A találmány tárgyát általában a kalcineurin foszfatázenzimes aktivitásának szabályozása és az interleukin-2 T-sejtek által való expressziójának befolyásolása képezi. Pontosabban, a jelen találmány tárgya a kalcineurin foszfatázaktivitásának gátlása bizonyos peptidekkel, és a T-sejt interleukinexpressziójának fokozása a sejtek bizonyos peptidekkel való kezelése révén.

A kalcineurin egy Ca^{2+} /kalmódulin dependens fehérjefoszfatáz, amely számos intracelluláris szignál bioszintézis út résztvevője [Guerini és Klee: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 86, 9183–9187 (1989)]. Az enzimet az élesztőtől az emlőssejtekig terjedő eukarióta sejtekben izolálták [Cyert és Thorner: *J. Cell. Biol.* 107, 841a (1989); Klee és munkatársai: *Adv. Enzymol.* 61, 149–200 (1984)]. Mivel a kalcineurin képes számos szignál bioszintézis útban részt venni ugyanabban a sejtben, ezért a kalcineurinaktivitás specifikus irányítására léteznie kell valamilyen eszköznek. Az enzimaktivitás specifikus irányításának egyik eszköze a kompartmentalizáció. A kompartmentalizáció elválasztja a szignál bioszintézis utakat, és hozzájárul a különböző ingerekre adott sejtválaszok specifikusságához. Bizonyos enzimek kompartmentalizációja úgy jön létre, hogy az enzimek specifikus rögzítőfehérjékkel lépnek kölcsönhatásba. Például a cAMP-dependens proteinkináz (PKA) specifikus intracelluláris pontokban rögzül, az A-kináz rögzítőfehérjékhez (AKAP-ok) kötődve. Mivel az AKAP-okról kimutatták, hogy nemcsak a PKA-fehérjéket kötik meg, ezért ezt a fehérjecsaldót a továbbiakban mint rögzítőfehérjéket említjük [Hirsch és munkatársai: *Journal of Biological Chemistry* 267, 2131–2134 (1992)]. A cAMP aktiválja a PKA-t, oly módon, hogy a nyugalomban levő PKA holoenzim szabályozó alegységeihez (R) kötődik, és ezzel az aktív katalitikus alegység (C) felszabadulását okozza. Az R alegységnek két osztálya létezik: az RI és az RII, amelyek az I-es és II-es típusú PKA holoenzimeket hozzák létre. Ezeknek a PKA izoformáknak a szubcelluláris eloszlása eltérőnek tűnik. Az RI izoformákról (RI α és RI β) leírják, hogy főleg a citoplazmában fordulnak elő, és ki vannak zárva a sejtmag-részből, míg az RII izoformák (RII α és RII β) szemcsészek, és a plazmamembránhoz, a citoskeletális komponensekhez, a szekréciós granulumokhoz, a Golgi-apparátushoz, a centroszómákhoz, vagy esetleg a sejtmagokhoz kapcsolódnak.

A rögzítőfehérjéket számos különböző szervezetben azonosították. Legalább hét olyan fehérjét azonosítottak az *Aplysia californica*-ban, egy gerinctelen tengeri állatban, amelyek megkötik a PKA szabályozó alegységét [Cheley és munkatársai: *Journal of Biological Chemistry* 269, 2911–2920 (1994)]. Ezek közül a fehérjék közül az egyik a yers membránfrakciókban és a taxollal stabilizált mikrotubulusokban dúsul fel, így tehát rögzítheti a mikrotubulusokat a sejtmembránhoz, és megkötheti a PKA-t. Azonosítottak egy emlős-rögzítőfehérjét, amely a mikrotubulusok rokona; a mikrotubulusokhoz kapcsolt fehérje 2 (MAP2) a PKA-t a citoskeletonhoz köti [Threurkauf és Vallee: *Journal of Biological Chemistry* 257, 3284–3290 (1982); DeCamilli és munkatársai: *J. Cell. Biol.* 103, 189–203 (1986)].

A MAP2-n a PKA-kötő hely egy 31 tagú peptid a molekula N-terminális régiójában [Rubino és munkatársai: *Neuron* 3, 631–638 (1989); Obar és munkatársai: *Neuron* 3, 639–645 (1989)].

5 Egy másik rögzítőfehérje, amely a mikrotubulusokhoz kapcsolódik, az AKAP 150, a dendritekben halmozódik fel, szoros kapcsolatban a mikrotubulusokkal [Glantz és munkatársai: *Mol. Biol. Cell.* 3, 1215–1228 (1992)]. Az AKAP 150 számos különböző neuronális sejttypusban megtalálható, és a rögzítőfehérjék azon családjának tagja, amely fehérjék a fő rögzítőfehérjék az emlősök agyában. Ennek a családnak egyéb tagja még az AKAP 75, amely a szarvasmarhák agyában található meg, és az AKAP 79, amely az emberi agyban található meg [Glantz és munkatársai: *Journal of Biological Chemistry* 268, 12 796–12 804 (1993)]. Az AKAP 75 a citoskeletális elemeket láthatóan két nem egybefüggő régió keresztül köti meg, amelyek az AKAP 75 N-terminálisának közelében vannak. Az AKAP 79 a humán előagyban főleg a posztzinaptikus „densities”-ben található meg [Carr és munkatársai: *Journal of Biological Chemistry* 267, 16 816–16 823 (1992)].

Egyéb rögzítőfehérjéket is leírtak. Leírták, hogy ha a granulosa-sejteket follikuluszserkentő hormonok és ösztadiol hatásának teszik ki, akkor ez serkenti egy 80 kDa méretű AKAP expresszióját [Carr és munkatársai: *Journal of Biological Chemistry* 268, 20 729–20 732 (1993)]. Egy másik AKAP-ot, jele Ht31, egy humán tiroid cDNS-könyvtárból klónoztak [Carr és munkatársai: *Journal of Biological Chemistry* 267, 13 367–13 382 (1992)]. Egy másik rögzítőfehérje, az AKAP 95, megváltoztatja az intracelluláris lokalizációját a sejtciklus során. Az AKAP 95 egy integrális sejtmagfehérje az interfázisban, de összekapcsolódik a citoplazmatikus PKA-val, ha a sejtmagmembrán lebomlik a mitózis során. Ez azt sugallja, hogy az AKAP 95 szerepet játszhat a PKA néhány izoformja célzási aktivitásában, a sejtciklushoz kötődő cAMP-re reagáló események során [Coghlan és munkatársai: *Journal of Biological Chemistry* 269, 7658–7665 (1994)]. Egyéb ismert rögzítőfehérje egy 85 kDa méretű AKAP, amely a PKA-t a Golgi-készülékhez kapcsolja [Rios és munkatársai: *EMBO J.* 11, 1732–1731 (1992)], és egy 350 kDa méretű AKAP, amely a PKA-t a centromérákhoz kapcsolja [Keryer és munkatársai: *Exp. Cell. Res.* 204, 230–240 (1993)].

Az ismert rögzítőfehérjék egy közös mechanizmussal kötik a PKA-t. Jóllehet a rögzítőfehérjék primer szerkezete nem konzerválódott, mindegyiknek van egy szekunder motívuma, amely egy amfipatikus hélixrégiót tartalmaz [Scott és McCartney: *Mol. Endo.* 8, 5–11 (1994)]. A rögzítőfehérjéknek a PKA szabályozó alegységéhez való kötődését egy olyan peptid blokkolja, amely utánozza a rögzítőfehérjék PKA-kötő régiójának ezt a helikális struktúráját. A peptid helikális struktúráját egy aminosavhelyettesítéssel elrontva meg lehet szüntetni a PKA-rögzítő fehérje kötésének blokkolását [Carr és munkatársai: *Journal of Biological Chemistry* 266, 14 188–14 192 (1991)], jelezve ezzel, hogy a PKA-kötés a rögzítőfehérjék amfipatikus hélixében fordul elő, és ezt a rögzítőfehérjék szekunder szerkezete

szabályozza. A PKA-nak ez a rögzítőfehérjékkel való intracelluláris rögzítése és lokalizálása lehetőséget ad egy kináz elválasztására, amely, a kalcineurinhoz hasonlóan, számos szignál bioszintézis útban általános, mégis bioszintézisút-specifikus módon képes hatni.

A PKA számos intracelluláris bioszintézis útban működik. Például, az AKAP 79 és a PKA közötti kötődés gátlásáról a hippokampusz neuronjaiban kimutatták, hogy gátolja az alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol propionsav/kainát glutamátreceptorokat [Rosenmund és munkatársai: *Nature* 368, 853–856 (1994)]. Ez azt mutatja, hogy a PKA szabályozza ezeket a receptorokat. A PKA ezenkívül szabályozza a glikogén foszforiláz-aktivitását, reverzibilisen foszforilezve az enzimet, az intracelluláris cAMP hormonálisan indukált növekedésére adott válaszként [Walsh és munkatársai: *Journal of Biological Chemistry* 243, 3763–3765 (1969)]. A cAMP-ről azt is kimutatták, hogy a Raf-1 aktiválását Ras-szal gátolja, ezáltal blokkolja a MAP kináz bioszintézis utat [Vojtek és munkatársai: *Cell* 74, 205–214 (1993)]; Hafner és munkatársai: *Mol. Cell. Biology* 14, 6696–6703 (1994)]. Ezek a bioszintézis utak számos sejt típusban lényegesek, és számos sejt funkcióban szerepet játszanak, azaz például az interleukin-2 gén transzkripcionális aktiválásában, ami a T-sejtek aktiválásának fontos lépése [Weiss és Littman, *Cell* 76, 263–274 (1994); Owaki és munkatársai: *EMBO J.* 12, 4367–4373 (1993)].

A PKA-hoz hasonlóan a kalcineurin is kapcsolódik a T-sejt aktiválásához [Clipstone és Crabtree: *Nature* 357, 695–697 (1992); O'Keefe és munkatársai: *Nature* 357, 692–694 (1992)]. A T-sejtekben a kalcineurin részt vesz az IL-2-expresszió szabályozásában a T-sejt serkentését követően [Weiss és Littman, *Cell* 76, 263–274 (1994)]. Az aktivált T-sejtek sejt-magfaktoráról (NFAT_p) kimutatták, hogy a kalcineurin foszfatázaktivitás szubsztrátja. Azt javasolták, hogy a T-sejt serkentését követően a kalcineurin által közvetített NFAT_p-defoszforilezés lehetővé teszi az NFAT_p transzlokációját a citoplazmából a sejt-magba, ahol az NFAT_p kölcsönhatásba lép a Fos-szal és a Jun-nal, ezzel indukálva az IL-2 gén expresszióját [Jain és munkatársai: *Nature* 365, 352–355 (1993)].

A kalcineurin szerepe a T-sejt aktiválásában célpontot ad a T-sejtek által közvetített rendellenességekkel szembeni terápiás beavatkozásra, és számos különböző gyógyszert fejlesztettek ki, amelyek gátolják a kalcineurint. Két kalcineuringátló anyagot, a ciklosporin A-t (ciklosporin) és az FK506-ot használnak a klinikákon [Thomson és Starzl: *Immunol. Rev.* 136, 71–98 (1993)]. Mind a ciklosporin, mind az FK506 csak azután gátolja a kalcineurint, hogy az különböző intracelluláris fehérjékhez kötődött, amelyek immunofilinnek néven ismertek (azaz ciklofilin és FKBP 12) [Schreiber és Crabtree: *Immunology Today* 13, 136–142 (1992)]. Tehát a ciklosporin és az FK506 prodrugként működik. A megfelelő immunofilinjükhöz való kötődés után a gyógyszer/immunofilin komplexek megkötik a kalcineurint, ezzel gátolják a foszfatázaktivitást.

A kalcineuringátlást leghatékonyabban a szervátültetést követő kilökődés kezelésében használták ki.

A ciklosporint és az FK506-ot vese-, máj-, szív-, tüdő- és csontvelő-átültetéseknél használják [The Canadian Multicentre Transplant Study Group: *N. Engl. J. Med.* 314, 1219–1225 (1986); Oyer és munkatársai: *Transplant Proc.* 15 Suppl. 1, 2546–2552 (1983); Starzl és munkatársai: *N. Engl. J. Med.* 305, 266–269 (1981); The Toronto Lung Transplant Group: *JAMA* 259, 2258–2262 (1988); Deeg és munkatársai: *Blood* 65, 1325–1334 (1985)]. Ezeknek a gyógyszereknek az alkalmazása jelentősen megnöveli az átültetett szövet túlélésének idejét, és csökkenti az átültetés utáni morbiditást [Najarian és munkatársai: *Ann. Surg.* 205, 142–157 (1985); Showstack és munkatársai: *N. Engl. J. Med.* 321, 1086–1092 (1989)].

A ciklosporint számos autoimmun betegségben is alkalmazzák. Az uveitisz általában néhány hetes kezelés után javul, de gyorsan újra romlani kezd, amikor a ciklosporinkezelést abbahagyják [Nussenblatt és munkatársai: *Am. J. Ophthalmol.* 96, 275–282 (1983)]. Hasonlóképpen, a pszoriázis általában javul a ciklosporinkezelés hatására, de gyorsan romlani kezd a kezelés abbahagyásával [Ellis és munkatársai: *JAMA* 256, 3110–3116 (1986)]. Az inzulinfüggetlenség „náaszút”-periódusait lehet indukálni és meghosszabbítani mind az I-es típusú, mind a II-es típusú diabetes mellitusz első előfordulásakor, ha ciklosporint adnak be az inzulinkezelés első két hónapjában [Feutner és munkatársai: *Lancet* 2, 119–124 (1986); Bougneres és munkatársai: *N. Engl. J. Med.* 318, 663–670 (1988)]. A nefropátiák variációi, beleértve a minimális változású fokális és szegmentális nefropátiát, a membrános és IgA által közvetített nefropátiát is, érzékenyek lehetnek a ciklosporinra, jóllehet a proteinuriában megfigyelt csökkenések a glomerális szűrési sebesség csökkenésének a következményei lehetnek és nem az alapmembrán gyöngyülésének a következményei [Tejani és munkatársai: *Kidney Intl.* 29, 206 (1986)]. A ciklosporinadagolásnak van dózisfüggő hatása a reumatoid artritiszre is, jóllehet az ilyen kezelés a nefrotoxicitás gyakori előfordulását is okozhatja [Førre és munkatársai: *Arthritis Rheum.* 30, 88–92 (1987)].

Amint az előzőekben említettük, a ciklosporin kötődik a nefrotoxicitáshoz [Mason: *Pharmacol. Rev.* 42, 423–434 (1989)].

Elnyomott vesefunkciók figyelhetők meg szinte mindegyik, ciklosporinnal kezelt betegben [Kahan: *N. Engl. J. Med.* 321, 1725–1738 (1989)]. Ez általában visszafordítható a ciklosporinkezelés leállításával. Sajnos a szervátültetésben részesült betegeknek a ciklosporin egyéb, általánosan használt immunosuppresszív szerekkel való helyettesítése az átültetett szövet kilökődésének veszélyével jár. A veseátültetést kapott betegeknek ez a dialízis újra beindítását teheti szükségessé. Azoknál a betegeknek, akik szívet, tüdőt vagy májat kaptak, az átültetett szövet kilökődése halálos lehet. Jóllehet kevésbé általános, mint a nefrotoxicitás, a ciklosporinterápiához kapcsolódik még neurotoxicitás és hepatotoxicitás is [de Groen és munkatársai: *N. Engl. J. Med.* 317, 861–866 (1987); Kahan és munkatársai: *Transplantation* 43, 197–204 (1987)].

Az FK506 használata is okoz jelentős toxicitást. A ciklosporinhoz hasonlóan az FK506 is okoz nefrotoxicitást [Peters és munkatársai: *Drugs* 4, 746–794 (1993)]. A klinikai megjelenés, a lézió morfológiája és előfordulása körülbelül ekvivalens a ciklosporinnal megfigyeléssel [McCauley: *Curr. Op. Nephrol. Hyperten.* 2, 662–669 (1993)]. Az FK506 okoz neurotoxicitást is [Eidelman és munkatársai: *Transplant Proc.* 23, 3175–3178 (1991); Fung és munkatársai: *Transplant Proc.* 23, 3105–3108 (1991)]. A ciklosporinnal ellentétben az FK506-nak inkább hepatotróp, mint hepatotoxikus hatása van [Peters és munkatársai: *Drugs* 4, 746–794 (1993)].

Korábbi vizsgálatok azt sugallják, hogy az AKAP 79 egy többfunkciós rögzítőfehérje, amely képes legalább két szignálzimmal asszociálódni, a PKA-val és a Ca^{2+} /kalmodulin dependens foszfatáz kalcineurinnal. Mindegyik szignálzim a rögzítőfehérje egy másik régiójához kötődik, és mindegyik enzim gátlódik, miközben rögzítve van. Emellett azt is kimutatták, hogy a Ca^{2+} /foszfolipid-dependens proteinkináz (PKC) kötődik az AKAP-hoz is, a PKA és a kalcineurin régiójától is eltérő régióhoz. A PKA-hoz és a kalcineurinhoz hasonlóan a PKC aktivitását is gátolja a rögzítőfehérjével való asszociáció. A PKC-kötő hely a rögzítőfehérje első 75 csoportjában található, és a peptidvizsgálatok igazolták, hogy az AKAP 79 31–52-es csoportjait tartalmazó fragmens gátolja a PKC aktivitását. A bizonyítékok azt is sugallják, hogy a kalmodulinnak a rögzítőfehérjéhez való kötődése felszabadíthatja a PKC aktivitását, ami arra utal, hogy az AKAP 79 szekvenciával verseng. Ahhoz, hogy még tovább jellemezzük a PKC-nak az AKAP 79-cel való kölcsönhatását, kísérleteket végeztünk a PKC kötőhely jellemzésére, a PKC/AKAP komplex szarvasmarhaagyból való izolálására és annak meghatározására, hogy a kalmodulin a PKC/AKAP 79 kölcsönhatás fiziológiai szabályozója-e.

A PKC-felülrétegzést először szarvasmarha-agyilizátumokkal végeztük, próbaként nyúlgy- PKC -t használva. A PKC-kötést egy M7 jelű monoklonális ellenanyaggal mutattuk ki, amely felismeri a PKC α és β izoformáját. Számos PKC-kötő fehérjét mutattunk ki, amelyeknek a mérete 50–300 kDa között van, idetartozik egy olyan fehérje, amely hasonló mobilitással vándorol, mint egy prominens 75 kDa-os RII-kötő fehérje. A kontrollkísérletek megerősítették, hogy a PKC-kötés specifikus, és csak 1,2 mmol/l $CaCl_2$, valamint 20 μ g/ml foszfatidil-szerin jelenlétében lehet kimutatni, valamint akkor, ha PKC-t adunk a reakcióelegyhez.

Ahhoz, hogy meghatározzuk, hogy az azonosított 75 kDa-os fehérje lehet-e az AKAP 79 szarvasmarha-homológja, a PKC-felülrétegzési vizsgálatot használtuk az AKAP 79 és a rokon fragmens vizsgálatára. Röviden, a fehérjéket SDS-poliakrilamid elektroforézissel (SDS-PAGE) választjuk szét, majd nitrocellulózra blotoljuk, standard protokollok alapján. A mintákat Blottóban [1 mg/ml szarvasmarha-szérumalbumin (BSA), 5% szárított tej TRIS-szel pufferelt sóoldatban (TBS)] blokkoljuk, majd egy óra hosszat szobahőmérsékleten inkubáljuk vizsgálopufferben [TBS, amely 1 mg/ml BSA-t,

1,2 mmol/l kalciumot, 1 mmol/l EGTA-t, 20 μ g/ml foszfatidil-szerint (PS), 2 μ g/ml leupeptint, 2 μ g/ml pepsztaint és 3 μ g/ml részlegesen tisztított nyúlgy- PKC -t tartalmaz]. A megkötött PKC-t az M7 monoklonális ellenanyaggal mutatjuk ki, amely mind az α , mind a β PKC-t felismeri, standard kemilumineszcenciás kimutató módszereket alkalmazva. A PKC megkötö a teljes hosszúságú rekombináns AKAP 79 fehérjét és rekombináns fragmenseit, amelyek a fehérjéhez kötött PKC első 75 csoportját tartalmazzák, de a kalcineurint és az RII kötő régiókat nem. A kontrollkísérletekkel ki lehetett mutatni, hogy a ^{32}P -radioaktív izotóppal jelzett RII mind a teljes hosszúságú AKAP 79-hez kötődik, mind a C-terminális fragmensekhez. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az AKAP 79 egy PKC-kötő fehérje, és a fő kötési helyek a fehérje első 75 aminosava között található.

PKC-kötő fehérjékkel végzett korábbi vizsgálatok azt sugallják, hogy a PKC-kötő helyekből bázikus és hidrofób régiók vesznek részt az enzimmel létrehozott foszfolipid híd kialakításában. Az AKAP 79 első 75 csoportja egy bázikus és hidrofób régiót tartalmaz a 31–52-es pozíciók között, és számos bizonyítékos azt sugallja, hogy ez a régió a PKC-vel való kontaktus fő pontja. A 31–52-es csoportoknak megfelelő szintetikus peptid blokkolja a PKC/AKAP 79 kölcsönhatást, amit a felülrétegzési vizsgálattal lehet meghatározni.

Ahhoz, hogy megbecsüljük ezeknek a peptideknek azt a képességét, hogy mennyire modulálják a PKC aktivitását, az alábbi vizsgálatot végezzük el az AKAP 79 peptidfragmensek jelenlétében és távollétében. PKC-t [50 nmol/l feloldva 50 mmol/l TRIS-HCl (pH=7,4), 5 mmol/l $MgCl_2$, 1,2 mmol/l $CaCl_2$, 1 mmol/l DTT, 1 mmol/l EGTA és 100 μ g/ml PS összetételű oldatban] inkubálunk öt percig 30 °C-on EGF receptor szubsztráttal (5 μ mol/l). A foszforilezési reakciót 100 μ mol/l ^{32}P -ATP (500 cpm/pmol) hozzáadásával iniciáljuk, majd hagyjuk a reakciót tíz percig lejátszódni 30 °C-on. A reakcióelegy aliquot részeit eltávolítjuk és p81 szűrőlapra cseppentjük, majd a reakciót úgy állítjuk le, hogy a szűrőpapírt fölöslegben levő 75 mmol/l koncentrációjú foszforsavval állítjuk le (háromszor háromperces mosás). Egy végső etanolos mosás után a p81 szűrőlapokat megszáritjuk és a radioaktivitást folyadékszcintillációs számlálóval határozzuk meg.

A 31–52-es csoportokat tartalmazó peptid, valamint az AKAP 79 első 75 csoportját tartalmazó rekombináns fragmens hatékony inhibitorai a PKC aktivitásának, 2 μ mol/l, illetve 25 nmol/l IC_{50} -értékkel. A részletesebb kinetikai elemzés kimutatta, hogy az AKAP 79 31–52-es peptidje a PKC kevert aktivitását mutatja, $K_i=1,411\pm 0,28$ μ mol/l értékkel, szubsztrátként az epidermális növekedési faktor (EGF) receptor peptidet használva. Ez a régió emellett hasonlít egy kalmodulinkötő doménre, és a rekombináns 1–75 fragmens vagy a 31–52-es peptid inkubálása a kalmodulinnal (15 μ mol/l) megakadályozza a PKC gátlását fölöslegben levő Ca^{2+} jelenlétében. Mivel az AKAP 79 egy kalmodulinkötő fehérje, ezért ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy a Ca^{2+} /kalmodulin szabályozhatja a PKC-nak a rögzítőfehérjéhez való kötődését.

Ezeket az eredményeket összegezve azt mondhatjuk, hogy a PKC *in vitro* asszociálódik az AKAP 79-cel, a PKC-kötő hely az AKAP 79 első 75 csoportjában található, és a 31–52-es csoportokat tartalmazó peptid gátolja a PKC aktivitását. Az eredmények azt is sugallják, hogy a PKC/AKAP 79 kölcsönhatást kalmodulinnal lehet szabályozni, mivel a főlegben levő Ca^{2+} /kalmodulin megakadályozza, hogy a 31–52-es peptid gátolja a PKC-t (3. példa). Ahhoz, hogy teljesen megértsük az AKAP 79/PKC kölcsönhatást, kísérleteket terveztünk arra, hogy 1. azonosítsuk a PKC-nek az AKAP 79-hez való kötődéséhez szükséges csoportokat, 2. izoláljunk egy PKC/AKAP 79 komplexet a sejtekből és 3. megállapítsuk, hogy a kalmodulin szabályozza-e a PKC/AKAP 79 kölcsönhatást.

Számos PKC-kötő fehérje szekvenciájának elemzése azt sugallja, hogy egy nagyon pozitív felszíni töltésre lehet szükség a PKC-vel való asszociációhoz. Ezzel a hipotézissel egybeesnek a korábbi eredmények, amelyekben az AKAP 79 31–52-es aminosavait tartalmazó peptidfragens, amely bázikus és hidrofób csoportok csoportját tartalmazza, gátolja a PKC aktivitását ($K_i = 1,4 \pm 0,28 \mu\text{mol/l}$), és ebből a régióból egy rekombináns fragens még ennél is hatékonyabb gátlója a kináznak ($IC_{50} = 24 \pm 5 \text{ nmol/l}$). Ahhoz, hogy megbecsüljük az AKAP 31–52-es csoportjai között található csoportjainak szerepét mint a PKC-gátlás determinánsait, az AKAP 79 mutánsokból egy családot állítottunk elő egy rekombináns AKAP 79 polipeptidben, amely az 1–75-ös aminosavakat tartalmazza, és vizsgáltuk az egyes mutánsok PKC-kötő tulajdonságait a felülretegzési módszerrel, valamint a PKC β I-vel szembeni gátló hatékonysággal szembeni változását.

Öt AKAP 79 mutánszt állítottunk elő, amelyekben a bázikus csoportok csoportját alaninnal helyettesítettük. Mivel a pozitív töltésnek nagy a sűrűsége, ezért valószínű, hogy számos bázikus oldallánc szimultán helyettesítésére lesz szükség, mielőtt a PKC-kötő affinitásban jelentős változások figyelhetők meg. Ezért több bázikus csoportot helyettesítettünk. Az AKAP 79 szekvenciában pontmutációkat hozunk létre az alanin letapogatási mutagenézissel [Hausken és munkatársai: *Journal of Biological Chemistry* 269, 24 245–24 351 (1994)]. Mindegyik AKAP 79 fehérjét His-tag fúziós fehérje formájában expresszáljuk, és nikkel affinitáskromatográfiával homogenitásig tisztítjuk. Az alanin mutáns peptideket az alábbiakban mutatjuk be. A 37. számú szekvencia a természetes AKAP 79 szekvencia.

AKAP 79 (37–50) FXRRKKAALAPK (37. számú szekvencia)

AKAP 79 AA38,39 FAARKKAALAPK (38. számú szekvencia)

AKAP 79 AAA40–42 FKRAAAALAPK (39. számú szekvencia)

AKAP 79 4A38-42 FAAAAALAPK (40. számú szekvencia)

AKAP 79 AA45,50 FKRRKKAALAPA (41. számú szekvencia)

AKAP 79 AA45,50 FKRRKKAALAPA (41. számú szekvencia)

AKAP 79 A37–50 FAAAAALAPA (42. számú szekvencia).

A PKC β I fehérjét bakulovírusban expresszáljuk és az M4, valamint M7 monoklonális ellenanyagot használjuk a PKC α és β izoformáinak kimutatására, az alábbi módszerrel.

Emellett mindegyik mutáns AKAP 79 fragmensnek vizsgáljuk azt a képességét, hogy gátolni tudja-e a PKC-t az alábbiakban ismertetett módszerrel.

Mivel az előzetes adatok azt sugallják, hogy a PKC és az AKAP 79 *in vitro* asszociálódik, ezért lehetséges lehet az AKAP 79/PKC komplex izolálása a sejtekből, ha azonos vagy hasonló kötés jön létre *in vivo*. Ahhoz, hogy megkíséréljük a PKC/AKAP 79 bináris komplex vagy egy PKC/AKAP 79/kalmodulin terner komplex izolálását szarvasmarhaagyból, két, egymástól független biokémiai megközelítést alkalmazunk, amelyek előzetesen sikeresek voltak egy *in vivo* AKAP 79/kalmodulin komplex izolálásában. A technikákat az alábbiakban röviden ismertetjük.

Az első vizsgálatokban az AKAP 79 homológját, az AKAP 75-öt immunprecipitáljuk szarvasmarhaagyból, AKAP 79 ellen készített MC16 monoklonális ellenanyag alkalmazásával. A PKC együtt tisztulását az immunprecipitátumban Western-blottal mutatjuk ki olyan poliklonális nyúlantiszérummal, amely felismeri a túlsúlyban levő agy PKC-izoformákat, azaz az α , β I, β III és γ izoformákat. Egy másik módszer szerint a PKC immunprecipitálódik a szarvasmarha-agykivonatokból az M7 monoklonális ellenanyaggal, amely felismeri az agy PKC α és β izoformáit, és az együtt tisztuló AKAP 75-öt RII felülretegzéssel vagy Western-blottal mutatjuk ki. Végezetül, az anti-PKC ellenanyagokkal immunprecipitált azonos mintákat kalmodulinra vizsgáljuk C24 monoklonális ellenanyaggal, amely felismeri a szarvasmarha-kalmodulin A alegységet. Ezekkel a kísérletekkel meg lehet állapítani, hogy vajon létrejött-e egy terner komplex az AKAP 79/PKC és a kalmodulin között.

Egy másik módszer szerint affinitástisztítást végzünk, azzal a céllal, hogy szarvasmarhaagyból izoláljunk egy RII, AKAP 79 és PKC közötti terner komplexet. A PKA R alegységét affinitáskromatográfiával tisztítjuk cAMP agarózra, majd az eluátumban Western-blottal megvizsgáljuk a PKC és az AKAP jelenlétét, M7 és MC16 monoklonális ellenanyagokat alkalmazva. Mivel a rekombináns AKAP 79 és PKC nem kötődik a cAMP-agarózhoz, akármelyik fehérjének a cAMP-eluátumban való kimutatása megerősíti egy komplex kialakulását a két kináz és a rögzítőfehérje között. A terner komplex létezését megerősíti a PKC-nak és az AKAP 79-nek cAMP-agarózzal való elúciója főlegben levő rögzítőfehérjével. Erről a peptidről előzőleg kimutattuk, hogy leszorítja az AKAP/kalmodulin komplexet a cAMP-agarózra immobilizált RII-ről.

Annak a korábbi igazolása, hogy az AKAP 79 megköti a kalcineurint, releváns annak a ténynek a fényében, hogy a kalcineurin két potens és klinikailag jól használható immunsuppresszív anyagnak, a ciklosporinnak és az FK506-nak a célpontja, amely anyagok gá-

tolják a kalcineurinaktivitást. Amint az előzőkben ismertettük, mind a ciklosporin, mind az FK506 jól használható számos különböző betegség kezelésében, de jelentős korlátozó mellékhatásaik vannak. Feltehetőleg azok a faktorok, amelyek módosítják a rögzítőfehérje/kalcineurin kötést, végül a ciklosporin vagy az FK506 aktivitásához hasonlóan módosíthatják a kalcineurin aktivitását. Egy ilyen modulátor azonosítása főleg, ha kevesebb mellékhatással rendelkezik, mint a többi immunosuppresszáns, valószínűleg széles körben alkalmazható lenne számos különböző betegség kezelésében, amelyeket jelenleg ciklosporinnal vagy FK506-tal kezelnek.

A ciklosporinnak és az FK506-nak számos klinikai indikációját írták le. Például a ciklosporint a poszttranszplantációs immunosuppresszió standardjaként határozták meg, lehetővé téve a máj-, tüdő-, bél- és hasnyálmirigy-átültetéseket, még akkor is, ha az FK506-ot általában erősebb immunosuppresszív szernek tartják. Azokat a betegeket, akik nem tolerálják a ciklosporint vagy az FK506-ot, vagy nem sikeres náluk ezeknek az alkalmazása, néha sikeresen átállítják a másik gyógyszerre.

Egy másik példa a gyulladásoz vastagbélbetegség (IBD), amely egy általános kifejezés két különböző betegségre, amelyeknek eltérő klinikai megjelenési formájuk van, azaz a Crohn-féle betegség és a fekélyes kolitisz (UC). A ciklosporint sikeresen használták a Crohn-féle betegség kezelésére, statisztikailag szignifikáns kezelési eredményekkel a betegség aktivitásának legalább egyik indexében [Brynskov: *Dan. Med. Bull.* 41, 332–344 (1994)]. Egyéb tünetek azonban, amelyek az akut rohamok feloldásával esnek egybe, nem mutattak szignifikáns, a javulásra utaló tendenciákat. A ciklosporinnak van aktivitása a súlyos szteroidrezisztens UC-ben (az adatok nem szignifikánsak, mivel a vizsgálatot etikai okok miatt leállították). Egy másik vizsgálatban olyan betegekkel, akiknek meszesedéses epevezetékgyulladásuk és UC-jük van, a szignifikancia határeset volt, az UC enyhébb lefolyása irányába. A visszaesés általában volt a kezelés leállítását követően, és a kezelést a toxicitási megfontolások korlátozták [Choi és Targan: *Dig. Dis. and Sci.* 39, 1885–1892 (1994)]. Emellett egyéb immunosuppresszív anyagokat használtak sikeresen az IBD-ben, azaz például metotrexátot, azatioprint és 6-AMP-t.

További példaként a ciklosporinról kimutatták, hogy hatékonyan lehet vele kezelni a reumatoid artritist számos vizsgálatban, ha a betegség második vagy harmadik vonalas kezelésében alkalmazták, azaz olyan betegeknek, akik nem reagáltak egyéb bevált kezelésekre, és a betegségük súlyos volt. Ezekben a nyomonban a ciklosporint általában ugyanolyan hatékonyan és toxikusnak találták, mint a többi második vonalas ágens, azaz az aranyat, maláriaellenes szereket, azatioprint, D-penicillamint és a metotrexátot [Wells és Tugwell: *Br. J. Rheum.* 32 (Suppl 1), 5156 (1993); Forre és munkatársai: *Arthr. Rheum.* 30, 88–92 (1987)]. A publikációkban csak „nagyon súlyos, makacs RA” kezelését írták le, a ciklosporin „potenciálisan irreverzibilis toxicitása” miatt [Dugados és Torley: *Br. J. Rheum.* 32 (Suppl 1), 57–59 (1993)]. A vesetoxicitásról azt gondolják, hogy elsősorban a vese vazokonstrukción keresztül valósul meg, amely súlyosítja az NSAID nefrotoxicitását és a reumatoid artritisszel együtt járó vesebetegséget [Leaker és Cairns: *Br. J. Hosp. Med.* 52, 520–534 (1994); Sturrock és munkatársai: *Nephrol. Dial. Transplant* 9, 1149–1156 (1994); Ludwin és Alexopoulou: *Br. J. Rheum.* 32 (Suppl 1), 60–64 (1993)].

A ciklosporinnal kezelt RA-betegekből származó vesebiopsziáknak körülbelül 10 százalékában figyelhető meg a ciklosporintoxicitásra jellemző morfológiai tulajdonságok [International Kidney Biopsy Registry of Cyclosporin in Autoimmune Diseases: *Br. J. Rheum.* 32 (Suppl 1), 65–71 (1993)].

Egy másik példában a ciklosporinról leírták, hogy a szteroiddependens asztma kezelésében jól használható. Egy vizsgálatban kisszámú beteget randomizáltak ciklosporinra vagy placebo-ra, és a ciklosporin csoportnál megnövekedett légáramlás és FVC volt megfigyelhető, valamint a prednizolon kevesebb mentőkezelésére volt szükség.

Egy másik példában a ciklosporinról kimutatták, hogy hatásos a szteroiddependens minimális változás nefrotikus szindrómában. Az ebben szereplő betegekről kimutatták, hogy kis dózisu ciklosporin esetében alacsonyabb szteroiddózisra volt szükségük, de mindegyik visszaesett, amikor a ciklosporinkezelést leállították. A nefrotikus szindróma szteroidrezisztens formáiban csak 20–30% a ciklosporinra adott válasz aránya [Meyrier: *Nephrol. Dial. Transplant* 9, 596–598 (1994); Hulton és munkatársai: *Pediatr. Nephrol.* 8, 401–403 (1994)].

A szisztémás lupus eritematózus (SLE) kezelésében egy vizsgálatról közölték, hogy az SLE aktivitása jelentősen lecsökkent, egy prospektív nem randomizált, nem ellenőrzött vizsgálatban [Tokuda és munkatársai: *Arthr. Rheumat.* 37, 551–558 (1994)]. A többi vizsgálatban azonban nem igazolták az SLE-ben való hatékonyságot.

Egy másik példában kimutatták, hogy a ciklosporin az inzulindependens diabetes mellitus visszafejlődését indukálja, ha az első jelentkezés után rövid idővel beadják. A visszafejlődés körülbelül egy évig tart, bár néhány esetben 850 napig is tartott [Jenner és munkatársai: *Diabetologia* 35, 884–888 (1992); Bougneres és munkatársai: *Diabetologia* 34, 429–434 (1991)]. Egy másik vizsgálatban azonban a vesefunkció leromlott a 12–18 hónapos kezelés során, és nem tért vissza teljesen a placebo szintre, jelezve, hogy valamilyen krónikus vesekárosodás fordulhatott elő [Feldt–Rasmussen és munkatársai: *Diabetes Medicine* 7, 429–433 (1990)]. Korábbi beavatkozásokra lenne szükség, hogy fokozzuk az immunosuppresszív terápia hatékonyságát az inzulindependens diabetes mellitus során. Néhány kutató elsőfokú rokonokat keres, és sikeres profilaktikus kezelést végez rajtuk diabetikus markerekkel [Elliott és Chase: *Diabetologia* 34, 362–365 (1991)].

Egy másik példában a pszoriázist hatékonyan kezelték ciklosporinnal [Cuellar és munkatársai: *Balliere's*

Clin. Rheum. 8, 483–498 (1994); Ellis és munkatársai: JAMA 256, 3110–3116 (1986)]. A magas dózisu terápia hatékony volt a pszoriaticus artritisz, a destruktív artritisznek egy különösen súlyos formájának a kezelésében, és a terápia megszakítását általában a bőr és ízület megbetegedésének súlyosbodása követte. A potenciális mellékhatások fényében, és a folyamatos, hosszú időtartamú kezelésre való igény miatt a ciklosporint csak a makacs pszoriaticus artritisz kezelésére ajánlják, amit egyéb eszközökkel nem lehet megfelelően kezelni.

Emellett a ciklosporinról kimutatták, hogy a súlyos atopikus dermatitisz kezelésében hatékony, placebóval kontrollált és kettős vakvizsgálatokban [Van Joost és munkatársai: Br. J. Derm. 130, 634–640 (1994); Cooper: J. Invest. Derm. 102, 128–137 (1994)]. A gyógyszerrel való kezelésből származó mellékhatásokat, úgymint a hányingert, hasi kellemetlenséget, parestesiákat, kolestiasist és veseelégtelenséget a betegek előnyben részesítették a kezeletlen betegséggel szemben. Egy másik randomizált kettős vak-, placebóval kontrollált vizsgálatban kiderítették, hogy a ciklosporinkezelés jelentősen javítja az élet minőségét a súlyos atopikus dermatitiszben szenvedő betegeknél [Salek és munkatársai: Br. J. Derm. 129, 422–43 (1993)]. A bőrléziók gyorsan visszatértek a ciklosporinkezelés leállítására után, de az élet minőségének javulása megmaradt.

Egy másik példában a ciklosporint a kezek krónikus dermatitisze kezelésére használták, egy olyan betegségben, amelynek a leírt elterjedtsége 4–22%, és általában topikális szteroidokkal kezelik, amelyekre számos beteg azonban nem reagál. Az alacsony dózisu ciklosporinról kimutatták, hogy hatékony volt 7 betegből hatban egy nyílt vizsgálatban [Reitamo és Granlund: Br. J. Derm. 130, 75–78 (1994)]. A betegeknek körülbelül fele visszaesett, miután a ciklosporinkezelést leállították.

Egy újabb példában a ciklosporint csalánkiütés és angioödéma, idiopaticus bőrbetegségek kezelésében használták, amelyek „hive”-ok és bőr alatti duzzadások formájában jelentkeznek. A patológia az emlősejtekhez kapcsolódik, és a kezelés gyakran hatástalan. Az egyik próbálkozás során három, makacs csalánkiütésben és angioödémában szenvedő beteget kezeltünk ciklosporinnal, és egy héten belül minden tünet elmúlt [Fradin és munkatársai: J. Am. Acad. Derm. 25, 1065–1067 (1991)]. A mellékhatások miatt mindegyik betegnél le kellett állítani a kezelést, és a tünetek a kezelés leállítására után visszatértek.

Ami az egyéb reumatológiai betegségeket illeti, hatékony ciklosporinkezelést írnak le egyéb, kevésbé általános autoimmun betegségekből, beleértve a Behcet-kórt [Pacor és munkatársai: Clin. Rheum. 13, 224–227 (1994)], Wegner-féle granulomatózis [Allen és munkatársai: Cyclosporin A Therapy for Wegner's Granulomatosis in ANCA-Associated Vasculitides: Immunological and Clinical Aspects, szerk.: Gross; Plenum Press (1993)], valamint az immunmediált trombocitopéniában [Schultz és munkatársai: Blood 85, 1406–1408 (1995)].

Számos, az előzőekben ismertetett vizsgálatban a ciklosporin vagy az FK506 használata több nemkívánatos

mellékhatással jár. Általában az általános immunszuppresszióval együtt jár a fertőzés és rákos elfajulás megnövekedett veszélye, és az valószínűtlen, hogy egy rögzítőfehérjéhez kapcsolódó immunszuppresszív szernek ne legyen hasonló hatása. Azonban más mellékhatások elkerülhetők vagy csökkenthetők, a rögzítőfehérje szövetspecifitása miatt. Mind a ciklosporinnak mind az FK506-nak a legáltalánosabb, súlyos mellékhatása a nefrotoxicitás, ami legalábbis bizonyos mértékig dózisfüggő, és a legtöbb betegben előfordul, a kezelés során általában a glomerális szűrés csökkenése formájában. Ez a mellékhatás azonban legalább részlegesen reverzibilis, ha a gyógyszer beadását megszüntetjük [Leaker és Cairns: Br. J. Hosp. Med. 52, 520–534 (1994)]. A tipikus esetben a progresszív veseelégtelenség nem fejlődik ki, jóllehet hosszabb követésre van szükség a határozott kiértékeléshez. A krónikus sérülést megfigyelték olyan betegekben, akik alacsony dózisu ciklosporint (3–4 mg/kg/nap) kaptak, ezeknek a betegeknek a biopsziái a szövetközi fibrózis változásait, tubuláris atrofíát és arteriolopátiát mutatnak [Svarstad és munkatársai: Nephrol. Dial. Transplant 9, 1462–1467 (1994); Young és munkatársai: Kidney International 46, 1216–1222 (1994)]. Az endoteliális sejtek változásai is nyilvánvalóak a hisztológiai szekciókban [Kahan: N. Engl. J. Med. 321, 1725–1748 (1989)]. A nefrotoxicitásról azt állítják, hogy elsődlegesen az arterioláris vazokonstrikció és krónikus alacsony fokú ischaemia következtében jött létre [Leaker és Cairns: Br. J. Hosp. Med. 52, 520–534 (1994)], jóllehet a gyógyszerekről is igazolták, hogy közvetlenül toxikusak a tubuláris sejtekre és a vaszkuláris szövetközi sejtekre [Platz és munkatársai: Transplantation 58, 170–178 (1994)]. Néhány közleményben azt írják le, hogy a nefrotoxicitás előfordulásának gyakorisága és súlyossága valamivel magasabb az FK506-nál [Platz és munkatársai: Transplantation 58, 170–178 (1994)].

Mások leírták, hogy mind a ciklosporinnak, mind az FK506-nak jelentős a toxicitása, aminek a klinikai megnyilvánulásai közé tartozik a roham, vakság, kóma, fejfájás, ataxia, Parkinson-szindróma, paresthesiasis, pszichózis, gócos deficitisz, akinetikus némaság, remegés, neuropátia és alvászavarok [Shimizu és munkatársai: Pediatr. Nephrol. 8, 483–385 (1994); Wilson és munkatársai: Muscle and Nerve 17, 528–532 (1994); Reece és munkatársai: Bone Marrow Transpl. 8, 393–401 (1991); Eidelman és munkatársai: Transpl. Proc. 23, 3175–3178 (1991); de Groen és munkatársai: N. Engl. J. Med. 317, 861–566 (1987)]. A májátültetést követően közepes-súlyos neurotoxicitás volt megfigyelhető azon betegek 10–20 százalékánál, akiket FK506-tal kezeltek, és a ciklosporinnal kezelt betegek 3–12 százalékánál. A neurotoxicitásról kimutatták, hogy a szérumból lipid-rendellenességekhez és a májdiszfunkcióhoz is kapcsolódik.

A ciklosporin és/vagy az FK506 egyéb mellékhatásai közé tartozik a hepatotoxicitás, glükózintolerancia, magas vérnyomás, nagyfokú szőrösödés, gasztrointesztinális tünetek, vénás trombózis, pankreatitisz és az inyhiperplázia [Morris: J. Heart Lung Transplant 12,

S275–286 (1993); Fung és munkatársai: *Transpl. Proc.* 23, 3105–3108 (1991); Mason: *Pharmacol. Rev.* 42, 423–434 (1989); Kahan: *N. Engl. J. Med.* 321, 1725–1738 (1989); Thomason és munkatársai: *Renal Failure* 16, 731–745 (1994)]. Ennek következtében, a ciklosporin és az FK506 széles körben való alkalmazásának fényében és a használatával együtt járó mellékhatások miatt nagy szükség lenne alternatív immunszuppresszív anyagok kifejlesztésére.

Lehetséges például, hogy a kalcineurin delokalizációja egy feltételezett T-sejt rögzítőfehérjéről gátolhatja a kalcineurin aktivitását a T-sejt-aktiválásban, ezzel T-sejt-specifikus immunszuppresszív anyagot szolgáltat, amelyet ugyanúgy lehet használni, mint a ciklosporint vagy az FK506-ot, de kevesebb a mellékhatása. Az a korábbi megfigyelés, hogy a PKA-nak a T-sejt rögzítőfehérjéről való delokalizációja fokozza az interleukin-2 expresszióját stimulált sejtekben, azt mutatja, hogy a rögzítőfehérje által lokalizált PKA valamilyen módon hozzájárul egy szabályozó szerephez az interleukin-2 expressziójában a T-sejt-aktiválás során. A PKA T-sejt specifikus delokalizációja tehát egy módja az interleukin-2 szekréció *in vivo* való fokozásának, ezzel utánozza a rekombináns interleukin-2 beadását, és valószínűleg csökkenti az interleukin-2-kezelés korábban ismertetett toxicitását, az alábbiakban ismertetett módon.

Az interleukin-2-t engedélyezték metasztatikus vese- és melanómák kezelésére, és a metasztatikus vese- és melanómában vagy malignus melanómában szenvedő betegek 15–20 százaléka reagál az interleukin-2-kezelésre. Ezek közül a reakciók közül néhány hosszú ideig tart, több mint 66 hónapig [Dillman: *Cancer Biotherapy* 9, 183–209 (1994); Whittington és Faulds: *Drugs* 46, 446–514 (1993)]. Míg a magas dózisú bolus kezelés számos súlyos mellékhatással jár (az alábbiakban ismertetett módon), az alacsony dózisú szubkután vagy folytonos infúziós terápia egy közepes választ okoz, míg csökkenti a toxicitást [Vogelzang és munkatársai: *J. Clin. Oncol.* 11, 1809–1816 (1993)].

Az interleukin-2-terápiát (interferon- α -val vagy anélkül, és egyéb reagensekkel) egyéb rosszindulatú betegségek kezelésében vizsgálták. Például hosszan tartó klinikai válaszokat, nem gyógyulásokat kaptak az interleukin-2-nek közvetlenül a tumorágyba való juttatásával, a glióma kivágását követően [Merchant és munkatársai: *J. Neuro.* 8, 173–188 (1990)]. Egyéb vizsgálatokban korlátozott hatékonyságot írtak le limfómában [Dillman: *Cancer Biotherapy* 9, 183–209 (1994)], kolorektális karcinómában [Whittington és Faulds: *Drugs* 46, 446–514 (1993)], korlátozott AML-ben [Bruton és Koeller: *Pharmacotherapy* 14, 635–656 (1994)], petefészekrákban és korai hólyagrákban [Whittington és Faulds: *Drugs* 46, 446–514 (1993)]. Az előzőekben említett kísérletekben szereplők száma azonban túl alacsony volt ahhoz, hogy megfelelő következtetéseket lehessen levonni például a hatékonyságról.

Az interleukin-2-t használták még az adoptív immunterápiával kombinálva, és igazolták, hogy hatékony a metasztatizáló vese- és melanómák kezelésére [Pierce és munkatársai: *Sem. Oncol.* 22, 74–80 (1995); Belldegrun

és munkatársai: *J. Urol.* 150, 1384–1390 (1993)]. Emellett az interleukin-2 hatékony lehet még bizonyos fertőző betegségek kezelésére, csökkentve a bőr baktériumterhelését és az antigén szintjét leprás betegekben, intradermális injekciót követően [Kaplan: *J. Infect. Dis* 167 (Suppl 1), S18–22 (1993)]. Azt is megfigyelték, hogy a PPD-pozitív egészséges kontrollokkal összehasonlítva a tuberkulózisban szenvedő betegekből származó limfociták alacsonyabb szinten termelnek interleukin-2-t [Sanchez és munkatársai: *Inf. Immun.* 6 5673–5678 (1994)], jelezve ezzel, hogy az interleukin-2-terápia értékes lehet a mikrobakteriális fertőzésekben.

Az interleukin-2 potenciális terápiás értéke ellenére a citokinnek jelentős toxicitása van [ha külön nem jelezzük, akkor a források a következők: [Dillman: *Cancer Biotherapy* 9, 183–209 (1994); Whittington és Faulds: *Drugs* 46, 446–514 (1993); Bruton és Koeller: *Pharmacotherapy* 14, 635–656 (1994)]. A kezelést korlátozó fő mellékhatás a kapilláriszívárgási szindróma. Az interleukin-2 beadása fokozza a vaszkuláris permeabilitást, ezzel szövetközi és tüdőödémát okoz, alacsony lesz a betegek vérnyomása, és jelentős számban presszorokra szorulnak. Az élénk folyadékkezelés életveszélyes tüdőödémákat okozhat. A betegeknek egészen 20 százalékának intubálásra és mechanikus lélegeztetésre van szükségük. A magas dózisú bolus beadási mód sokkal súlyosabb szövődményeket okoz, mint az alacsony dózisú vagy folyamatos infúziós, és bizonyos csoportokban a betegek 100 százalékának ICU-támogatásra van szükségük az interleukin-2 kezelés során. Megfigyelték miokarditist, kardiomiopátiákat és szívritmiákat is. Az akut veseelégtelenség a kapilláriszívárgás szindróma által okozott hipotenzió eredményeképpen jöhet létre.

Az interleukin-2 okozhat súlyos hasmenést is, az elektrolit-egyensúly felborulásával, tiroid abnormalitásokkal és akut pankreatitisszel. A transzfúziókat igénylő anémia a betegek 15–20 százalékában fordul elő [MacFarlane és munkatársai: *Cancer* 75, 1030–1037 (1995)]. Trombocitopénia fordulhat elő vérzéssel, és a véralvadási bioszintézis út hibái is általánosak. A betegeknek több mint 70 százalékának megváltozik a mentális állapota, beleértve a paranoid téveszméket, hallucinációkat, az érdeklődés elvesztését, alvászavarokat és álmodást. Leírták kómát, látászavarokat, tranzienst iszkémiás támadásokat és paresthesiákat is. Ezek az endogén és exogén interleukin-2-höz kötődő hátrányok azt sugallják, hogy potenciális kezelési alternatívákat kell keresni, azaz például amelyekben az endogén interleukin-2-termelés szabályozható, és ezzel el lehet kerülni az exogén interleukin-2-vel való kezelést.

Amellett, hogy lehetséges eszközöket szolgáltat az immunszuppresszív gyógyszerek és az interleukin-2-termelés modulátorainak szabályozására, a rögzítőfehérjék azonosítása az egyéb sejtaktivitás szabályozását is lehetővé teszi, annak a sokféle metabolikus bioszintézis útnak a fényében, amelyekben a rögzítőfehérjék láthatóan szerepet játszanak. Például az AKAP 79 fontos a glutamát-receptorral szabályozott ioncsatornák szabályozásában a neuronok posztszinaptikus sűrűsödésé-

ben, valószínűleg a PKA-n, PKC-n és kalcineurinon keresztül. A PKA szabályozza az AMPA receptorral szabályozott csatornák aktivitását, és a PKA delokalizálása vagy gátlása gyengíti az ionszatorna aktivitását. A PKC szabályozza az NMDA receptor által szabályozott csatornákat, és a kalcineurinnal kimutatták, hogy az NMDA receptort érzéketlenné teszi az ingerekre. Ezek a megfigyelések azt jelzik, hogy a lokalizált kinázok (PKA és PKC) szabályozhatják a glutamátreceptorok aktivitását a neuronokban. A kalcineurinnal való defoszforilezés az NMDA receptorok ellenszabályozási mechanizmusa. Ez a modell fiziológiásan megegyezik a ciklosporinnal vagy FK506-tal indukált rohamok bizonyítékaival.

A glutamátreceptorok mellett számos neurológiai megbetegedésben is szerepet játszanak. A glutamát és egyéb excitációs aminosav excitotoxicitást okozhat a neuronokban, és a posztzinaptikus glutamátreceptorok főlegesen serkentéséről kimutatták, hogy a neuronokra toxikus, akut neuronális degenerációt okoz. A hipoxiáról (ami például sztrók vagy szívéleállás után következik be) és a CNS-traumáról kimutatták, hogy a glutamát jelentős mennyiségének az extracelluláris térbe való jutását okozza, ami azután kölcsönhatásba lép a glutamátreceptorokkal, és beindítja az excitotoxikus kaskádát. Az antiexcitációs ágensekről kimutatták, hogy állatmodellekben védelmet nyújtanak az agysérüléssel szemben [Olney, *Neurobiology és Aging* 15, 259–260 (1994)]. Érdekes módon az NMDA antagonisták toxikusak bizonyos típusú neuronokra, jelezve, hogy a glutamát gátolhat egyéb excitációs bioszintézis utat ezekben a sejtekben. A makrolid antibiotikumokról, azaz például az FK506-ról is kimutatták, hogy védenek az NMDA, de nem védenek a kainát excitotoxicitás ellen tenyésztett neuronokban [Manev és munkatársai: *Brain Res.* 624, 331–335 (1993)].

A glutamát a Parkinson-kórban is szerepet játszik. Az NMDA antagonisták védik a dopaminerg neuronokat a substantia nigra MPTP-vel érintkezésbe hozott majmokban, ami egy, az emberekben és egyéb főemlősökben Parkinson-szindrómát okozó anyag. Az amantidin és a memantin NMDA antagonisták, ezeket Európában Parkinson-kór kezelésére használják, azonban mind a kettő pszichózt okozott néhány betegben. Arra is van valamennyi bizonyíték, hogy a glutamaterg neuronok lehetnek hiperaktívak a Parkinson-kórban, és a gátlásuk csökkentheti a betegség motorszindrómáját [Lange és Rieder: *Life Sciences* 55, 2067–2075 (1994)].

A glutamát a rohamokban is szerepet játszik, a roham iniciálásában, elterjedésében és fenntartásában. Az NMDA és nem-NMDA antagonisták hatékony antikonvulzánsok [Meldrum: *Neurology* 44 (Suppl 8), S14–S23 (1994)]. Az AMPA receptorok az ALS-ben is szerepet játszanak, és egy receptorantagonista vizsgálata jelenleg is folyamatban van.

Az előző megfigyelések fényében nem meglepő, hogy számos egyéb immunosuppresszív anyag van klinikai vizsgálat alatt. Az alábbi információkat a szakirodalomból merítettük [Haydon és Haynes: *Balliere's Clin. Gastroentero.*, 8, 455–464 (1994); Thomason és

Starzi: *Immunol. Rev.* 1993 71–98 (1993); Morris: *J. Heart Lung Transplant* 12, S275–S286 (1993)]. Az azaspirán például egy SKB vegyület, amely elnyomja a graftsejtek beszűrődését és az interleukin-2 receptor indukcióját, valamint megszünteti az interleukin-2 és az IFN- γ termelődését. Az azaspirán láthatóan valamilyen típusú szuppresszor sejtet indukál, és van valamennyi bizonyíték arra, hogy a ciklosporinnal szinergizál.

Egy másik példa a mikofenolát mofetial, egy Syntex-vegyület, amely gátolja a purin szintézisét és T-sejt, valamint B-sejt szelektív szaporodást gátló hatása van. Kimeríti az ellenanyagokat. A mikofenolát mofetial kimerítheti a tapadási molekulákat is a sejtek felszínéről. Közben a vegyületnek láthatóan alacsony a toxicitása, leukopéniát okozhat, és 20 éve a psoriasis kezelésére használják.

Egy másik példa, a mizoribin egy Sumitomo-vegyület, amely gátolja a DNS szintézisét. A hatásmechanizmus azonos a mikofenolátéval.

Egy másik példa, a brequinar egy DuPont–Merck-vegyület, amely gátolja a pirimidin szintézisét, blokkolja a dihidroorotát-dehidrogenázt. A klinikai vizsgálatok teljes leírásának közzétevése várható. Az anyagról leírták, hogy a ciklosporinnal szinergikusan hat, de okozhat trombocitopéniát, dermatitist és mukozitist.

Egy további példa, a 15-dezoxi-spergualin egy Nippon–Kayaku-vegyület, amely elsősorban a monocita/makrofág funkciót gátolja, beleértve az oxidatív metabolizmust, a lizoszomális enzimszintézis, az interleukin-1 szintézisét és az MHC II osztályú antigének sejtfelszíni expressziójának gátlását. 70–90 százalékban hatékony makacs vesekülködésben, de magasabb dózisban csontvelő-toxicitás előfordulhat.

Újabb példa a leflunomid, egy Hoechst-vegyület, amely gátolja a citokin hatását, blokkolja a T-sejt aktiválását és az ellenanyag szintézisét. Nem toxikus a vesékre vagy a csontvelőre.

Másik példa a rapamicin, egy Wyeth–Ayerst-vegyület, amely az FK506-tal rokon. Ez egy prodrug, amelynek az aktiválódáshoz az immunofilinhez kell kapcsolódnia, és nem gátolja a kalcineurint vagy nem blokkolja a T-sejtek citokintermelését. Ismeretlen mechanizmus útján a rapamicin gátolja a G1-ből az S-fázisba való átmenetet.

Az immunosuppresszív ágensek jelentős potenciális toxicitásának fényében az nyilvánvaló, hogy a szakterületen szükség van még olyan ágensekre, amelyek gátolják a kalcineurint. Ezek az ágensek előnyösen kevesebb toxikus mellékhatással rendelkeznek, mint a jelenleg elérhető ágensek, és így előnyösebben használhatók az immunosuppresszív terápiában. Emellett igény van olyan ágensekre is, amelyek gátolják a PKA-t T-sejtekben, ezáltal lehetővé teszik az interleukin-2 fokozott expresszióját a sejtekben.

A jelen találmány részben azon alapul, hogy a kalcineurin köti az AKAP 79-et. Azáltal, hogy mind a PKA-t mind a kalcineurint megköti, az AKAP 79 együtt lokalizál egy kinázt és egy foszfatázt, ami szabályozhatja az áramlás sebességét egy specifikus szignál bioszintézis útban. Ennek megfelelően a jelen találmány tárgyát ké-

pezik készítmények és kalcineurinizolálási módszerek, valamint a kalcineurin aktivitásának gátlása a sejtben. Az izolálási módszer abban áll, hogy egy sejtfrakciót AKAP 79-cel vagy annak egy kalcineurint kötő fragmensével hozunk érintkezésbe, amit egy szilárd hordozóhoz immobilizáltunk, majd erről eluáljuk a kalcineurint. A kalcineuringátlási módszer abban áll, hogy a sejtet AKAP 79-cel vagy annak egy kalcineurint kötő fragmens peptidjével hozzuk érintkezésbe. Előnyösen a kalcineurinkötő peptid nem kötődik a PKA-hoz is. Az előnyös peptidek az alábbi aminosavszekvenciát tartalmazzák:

Arg-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Ser-
Ser-Lys-Glu-Glu-Lys-Pro
(1. számú szekvencia).

A jelen találmány szerinti kalcineuringátlási módszerekben használható egyéb peptidek közé tartoznak az alábbiak:

Arg-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Ser-
Ser-Lys-Glu-Glu-Lys-Pro-Leu-Gln
(2. számú szekvencia)

és

Arg-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Ser-
Ser-Lys-Glu-Glu-Lys-Pro-Phe-Lys
(3. számú szekvencia).

Ezek a peptidek homológok az AKAP 79-nek azokkal az aminosavszekvenciáival, amelyek kötik a kalcineurint. Jóllehet a peptidek hasonlóak az FKBP12 kalcineurint kötő régiójához, az FK506/FKBP12 komplex kalcineuringátlásától eltérően a peptidek gátolják a kalcineurinaktivitást, anélkül, hogy egyéb molekulával való kölcsönhatásra szükség lenne.

A peptidek módosíthatók, hogy ezzel megkönnyítsük a sejtbe való bejutást, azaz például egy lipidoldékony molekulával való konjugációval. A peptidek például konjugálhatók mirisztinsavval. Egy másik módszer szerint a peptidek liposzómákba csomagolhatók, amelyek fuzionálhatnak a sejtmembránokkal és a peptideket a sejtbe bocsáthatják ki.

A jelen találmány tárgyát képezik azok a módszerek, amelyekkel meg lehet határozni, hogy a sejt tartalmaz-e kalcineurinkötő és PKA-kötő rögzítőfehérjét. A módszerek általában abból állnak, hogy a sejtet lizáltatjuk, lizátumot képezve; a lizátumot egy szilárd hordozóval inkubáljuk, amely szilárd hordozót jelzett PKA szabályozó alegységgel hozzuk érintkezésbe, lemoszuk a meg nem kötött szabályozó alegységet a szilárd hordozóról; kimutatjuk a szilárd hordozón maradt jelzést; és ebből meghatározzuk egy kalcineurinkötő és PKA-kötő rögzítőfehérje jelenlétét a sejtben. Egy másik módszer szerint a PKA szabályozó alegységét a szilárd hordozóra immobilizálhatjuk és a kalcineurin lehet a jelzett molekula. A PKA szabályozó alegység általában egy RII alegység.

Ezek a módszerek jól használhatók további fehérjék azonosítására, amelyek mind a PKA-t, mind a kalcineurint megkötik. Egyéb ilyen fehérjék azonosítása további szövetspecifikus célpontokat szolgáltat a terápiás beavatkozáshoz.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá azok a módszerek, amelyekkel olyan vegyületek azonosítható-

tók, amelyek módosítják a kötődést a kalcineurin és egy kalcineurin rögzítőfehérje között. Vagy a kalcineurin, vagy a rögzítőfehérje hozzákötődhet egy szilárd hordozóhoz. A megkötetlen kötőpartner kimutathatóan jelezzük. A kötőpartnereket egy tesztvegyület jelenlétében inkubáljuk. A tesztvegyület hatását a kalcineurin és kalcineurin rögzítőfehérje közötti kötésre úgy határozzuk meg, hogy megfigyeljük az immobilizált kötőpartner által megkötött jelzés mennyiségét. Ha a tesztvegyület jelenlétében kisebb mennyiségű jelzés kötődik meg, mint a tesztvegyület távollétében, akkor ez azt jelzi, hogy a tesztvegyület a kalcineurin és a kalcineurin rögzítőfehérje közötti kötődés gátlószere. Egyéb vizsgálatok, azaz a szcintillációs „proximity” vizsgálatok is alkalmazhatók.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá azok a módszerek, amelyek fokozzák az interleukin-2 expresszióját a T-sejtekben. A PKA kináz aktivitásának gátlása, vagy a PKA lokalizálása a T-sejtekben fokozza a fehérjék expresszióját olyan promotor elemek szabályozása alatt, amelyek szabályozzák az interleukin-2 gén transzkripcióját. Ezek a módszerek általában abban állnak, hogy a T-limfocitát érintkezésbe hozzák az alábbi aminosavszekvenciák közül az egyikkel:

Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile-His-Asp-Ile
(5. számú szekvencia) vagy

Asp-Leu-Ile-Glu-Glu-Ala-Ala-Ser-Arg-Ile-Val-Asp-
Ala-Val-Ile-Glu-Gln-Val-Lys-Ala-Ala-Gly-Ala-Tyr
(9. számú szekvencia).

Az 5. számú szekvencia egy olyan peptid, amely gátolja a PKA kináz aktivitását. A 9. számú szekvencia egy olyan peptid, amely homológ a HT31 rögzítőfehérje egy PKA-kötő régiójával. Ezek a peptidek módosíthatók, hogy megkönnyítsük a bejutásukat a sejtekbe, vagy liposzómákba csomagolhatók, az előzőekben ismertetett módon. A találmány tárgyát képezi számos, a peptidek alkalmazásán alapuló felhasználási módszer. Például a módszerek alkalmazhatók arra, hogy az immunválaszt serkentsük, hogy serkentsük az aktivált T-sejteket a szelektált klonális expanzióban, vagy hogy fokozzuk a T-sejtek választát a kísérleti ingerekre, hogy kiértékeljük a T-sejt biológiájában a korai eseményeket és az immunválasz aktiválását.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a mellékelt ábrákat.

Az 1A-1B. ábrákon a kalcineurin foszfatázaktivitásának gátlása látható teljes hosszúságú AKAP 79-cel és az AKAP 79 egy kalcineurint kötő fragmensével.

A 2A-2C. ábrákon a II-es típusú PKA és a kalcineurin szubcelluláris lokalizációja, valamint a II-es típusú PKA és a kalcineurin kolokalizációja látható.

A 2A-2C. ábrákon a II-es típusú PKA és a kalcineurin szubcelluláris lokalizációja, valamint a II-es típusú PKA és a kalcineurin kolokalizációja látható.

A 3. ábrán a 11.1-es klón és a humán kalcineurin 11.1-es izofonmája közötti homológia látható.

A 4. ábrán az intracelluláris cAMP-koncentráció növekedése látható, amely a Jurkat-sejtek forskolinnal és IBMX-szel való kezelésével indukálunk.

Az 5A–5H. ábrákon FACS görbék láthatók, amelyek a PKA inhibíció hatását, valamint az interleukin–2 promotor által vezérelt fehérjetranszkripció delokalizációját mutatják be.

A jelen találmány szerinti módszerekben alkalmazott peptideket szintetizálhatjuk oldatban vagy szilárd hordozón, a szakirodalomban ismertett szokványos technikák alkalmazásával [Stewart és Young: *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2. kiadás, Pierce Chemical Company (1984); Tam és munkatársai: *J. Am. Chem. Soc.* 105, 6442 (1983), amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk]. A peptideket mirisztilezhetjük standard technikák alkalmazásával [Eichholtz és munkatársai: *Journal of Biological Chemistry* 268, 1982–1986 (1993), amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk]. A peptidek liposzómákba való kapszulázását a szakirodalomban ismertett standard technikákkal végezhetjük el [US 4,766,046, 5,169,637, 5,180,713, 5,185,154, 5,204,112 és 5,252,263 amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk].

Az alábbi példák bemutatásával célunk a találmány tárgyának illusztrálása és nem a korlátozása. Az 1. példában az AKAP 79 és a PKA kalcineurinnal való asszociációját ismertetjük. A 2. példában a kalcineurinaktivitás gátlását mutatjuk be, az AKAP 79 aminosavszekvenciákból származó peptidek alkalmazásával. A 3. példában a II-es típusú PKA és a kalcineurin szubcelluláris eloszlását mutatjuk be. A 4. példában egy dihibridvizsgálatot ismertetünk, amely az AKAP 79 és a kalcineurin közötti fiziológiás kötődést ismerteti. Az 5. példában az AKAP 79 és a kalcineurinkötődés elemzését ismertetjük. A 6. példában a kalcineurin mutánsok alkalmazását írjuk le egy AKAP 79 kötőhely meghatározásában. A 7. példában az AKAP 79 és a PKA RI alegység közötti kölcsönhatást mutatjuk be. A 8. példában eljárást ismertetünk a PKA kompartmentalizációt gátló anyagok szűrővizsgálatára. A 9. példában a rögzítőfehérjék részvételét ismertetjük az interleukin–2-expresszió modulációjában. A 10. példában egyéb AKAP 79 kötőfehérjék azonosítását mutatjuk be.

Korábbi megfigyelések azt mutatták, hogy az FKBP/FK506 immunofilin komplex és a kalcineurin A közötti kölcsönhatáshoz kalcineurin B-re is szükség van [Haddy és munkatársai: *FEBS* 314, 37–40 (1992)]. Ahhoz, hogy meghatározzuk, hogy az y190 élesztőtörzsben endogén módon expresszált kalcineurin B részt vesz-e a megfigyelt AKAP 79/kalcineurin kötődésben, egy y153b jelű kalcineurin B⁻ törzset használtunk (Mat a gal14 gal80, his3 trp1-901 ade2-101 ura3-52 leu2-3-112+URA::GAL→lacZ, LYS2::GAL→HIS3cnb1Δ1::ADE2), hogy elimináljuk annak lehetőségét, hogy a kalcineurin részt vesz a kalcineurin A/AKAP 79 kötődésben. Az y153b-t először pAS1-gyel, valamint pAS1 AKAP 79-cel transzformáljuk, és vizsgáljuk a β-galaktoszidáz-aktivitást egy zsákmány-

plazmid távollétében. Nincs kimutatható riportergén-expresszió, jelezve, hogy a 11.1-es klónnal való transzformációt követően a riportergén expressziója szükségszerűen az AKAP 79/11.1 kötődésből származik. Ezután a pACT kalcineurin 11.1 és a pACT kalcineurin 1–400 plazmidot egymástól függetlenül bejuttatjuk az y153b1 pAS1 AKAP 79 törzsbe, standard eljárások alkalmazásával. Mindegyik, az előzőekben említett plazmidokkal transzformált törzsben megfigyelhető a β-galaktoszidáz-aktivitás, jelezve, hogy az AKAP 79 és a kalcineurin közötti kölcsönhatáshoz nincs szükség kalcineurin B-re. Ez az eredmény sugallja továbbá azt is, hogy az FKBP/FK506 immunofilin komplexnek a kalcineurin A-hoz való kötődése eltér az AKAP 79 kötődéstől.

1. példa

Ebben a példában a kalcineurinnak az AKAP 79-cel és a PKA-val való természetes asszociációját mutatjuk be. Az AKAP 79 tehát úgy működik, hogy kolokalizálja a mindenütt előforduló kinázt és foszfatázt. Ez a kolokalizáció lehetőséget ad az enzimek specifikus szabályozására a szignál bioszintézis utakban, az enzimek foszforilezése és defoszforilezése révén.

A kalcineurin immunprecipitációját egy kalmodulin-agarózzal tisztított szarvasmarha-agykivonathól úgy érjük el, hogy vagy a kalcineurin A-ra vagy a kalcineurin B-re specifikus, affinitástisztított ellenanyagokat alkalmazunk, a Harlow és Lane által ismertett általános eljárás szerint [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1988)], azzal az eltéréssel, hogy egy végső „A” mosópuffert is alkalmazunk [(10 mmol/l HEPES pH=7,9, 1,5 mmol/l MgCl₂, 10 mol/l KCl, 1 mmol/l PMSF és 10 μmol/l IBMX)+0,4 mol/l nátrium-klorid]. A PKA aktivitását a Scott és munkatársai által ismertett módszerrel mérjük [Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 82, 4379–4383 (1985), amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk], az immunprecipitátum 0,1 mmol/l cAMP-vel való eluálása után. Az immunprecipitált fehérjék foszforilezését 0,1 mmol/l ³²P-ATP (1,5 × 10⁵ cpm/nmol) hozzáadásával iniciáljuk, majd miután 30 percig 30 °C-on tartottuk, a reakciókat SDS felvivőpuffer hozzáadásával állítjuk le, és SDS-poliakrilamid gélelektroforézisnek vetjük alá. A PKA R alegységét az agykivonat 30–60%-os (NH₄)₂SO₄ frakciójából tisztítjuk, a Coghlan és munkatársai által ismertett módszerrel, cAMP-agarózt használva [Journal of Biological Chemistry 269, 7658–7665 (1994), amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk], azzal az eltéréssel, hogy a fehérjét 0,5 mmol/l Ht31 peptiddel (4. számú szekvencia) eluáljuk. A Western-blotokat és a PKA RII felülrétegeket a Coghlan és munkatársai által ismertett módszerrel végezzük [Journal of Biological Chemistry 269, 7658–7665 (1994)].

Kinázaaktivitást mutatunk ki a kalmodullinnal tisztított kivonatban, ezt azután 123 ± 3,6-szeresére dúsítjuk (±standard deviáció; n=3) a kalcineurin immunprecipitátumban, majd specifikusan gátoljuk egy olyan peptiddel, amely gátolja a PKA-kináz-aktivitást, azaz a PKI

peptiddel (5. számú szekvencia), jelezve, hogy a PKA katalitikus (C) alegysége az izolált komplex egy komponense volt. Az AKAP 79 (AKAP 75) és az RII szarvasmarha-homológja, mindegyik szubsztrátja a C alegységnek, szintén jelen van az immunprecipitátumban, és cAMP, valamint ^{32}P -ATP hozzáadásával foszforilezzük. Kiegészítő kísérletekben a PKA R alegységeit nyers szarvasmarha-agykivonatból izoláljuk cAMP-agonzon végzett affinitáskromatográfiával. Az affinitásoszlop Ht31 peptiddel való kezelésének hatására az AKAP 75 specifikusan eluálódott a cAMP által megkötött RII-ről, és eleresztette mind a kalcineurin A mind a kalcineurin B alegységeket. A lizátumban levő összes kalcineurin körülbelül 5%-áról kiderült, hogy asszociálódik az AKAP 75-tel és az RII-vel, a Western-blotol végzett kimutatás alapján. Ezek az eredmények összegezve azt sugallják, hogy a PKA és a kalcineurin egyszerre asszociálódik a rögzítőfehérjével.

2. példa

Ebben a példában a kalcineurin foszfatázaktivitásának gátlását mutatjuk be, az AKAP 79-ből származó peptidekkel.

Annak meghatározására, hogy az AKAP 79 peptid kötődése gátló hatású-e, a kalcineurinaktivitást vizsgáljuk rekombináns AKAP 79 jelenlétében. Röviden, rekombináns AKAP 79-et expresszálunk *Escherichia coli*-ban Carr és munkatársai leírása szerint [Journal of Biological Chemistry 267, 16 816–16 823 (1992), amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk]. A kalcineurint és a konstitutíve aktív csonkított CaN_{420} mutánst [a kalcineurinnek egy csonkított, Ca^{2+} /kalmódulin független, konstitutíve aktív formája] Sf9 sejtekben expresszáljuk, majd kalmódulin-Sepharose-on tisztítjuk Perrino és munkatársai leírása szerint [Journal of Biological Chemistry 267, 15 965–15 969 (1992), amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk]. A ^{32}P RII peptid szubsztráttal szemben mutatott foszfatázaktivitást a Perrino és munkatársai által ismertetett módszerrel mérjük [Journal of Biological Chemistry 267, 15 965–15 969 (1992)]. 30 nmol/l kalcineurint 10 nmol/l kalmódulint és 22 $\mu\text{mol/l}$ ^{32}P RII peptidet inkubálunk AKAP 79 fehérjével és AKAP 79 peptiddel (1. számú szekvencia, 81–102-es aminosavak), az 1B. ábrán látható koncentrációtartományban. A kalmódulint kihagyjuk a CaN_{420} -vizsgálatokból. A szubsztrátról felszabadult ^{32}P -t három párhuzamos mintában, három párhuzamos kísérletben mérjük scintillációs számlálóval. A rekombináns AKAP 79-nek a kalcineurinral szemben mutatott inhibíciós konstansát (K_i) az adatok lineáris regressziós elemzésével határozzuk meg. Az AKAP 79 peptid K_i -értékeit úgy becsüljük meg, hogy meghatározzuk az IC_{50} -értéket, K_m -nél rögzített szubsztrátkoncentráció mellett (42 $\mu\text{mol/l}$).

Az 1. ábrán a teljes hosszúságú kalcineurin (Ca^{2+} /kalmódulin dependens) (körök) és a CaN_{420} (négyzetek) AKAP 79-cel való gátlása látható nem kompetitív módon, a foszforilezett RII peptid szubsztrát viszonylatában. Az üres jelek az AKAP 79 távollétében mért foszfatázaktivitást mutatják, a kitöltött jelek az AKAP 79 jelen-

létében mért foszfatázaktivitást mutatják. Az AKAP 79 peptidnek megfelelő szintetikus peptid gátolja mind a teljes hosszúságú kalcineurint (kitöltött körök), mind az CaN_{420} -t, míg a Ht31 peptid nem gátolja a kalcineurint (1B. ábra). A megfigyelt gátlás a kalcineurinra specifikus; az AKAP 79 peptid nem érinti szignifikánsan a fehérjefoszfatázok aktivitását (üres négyszögek) vagy 2A. (keresztek), még 0,4 mmol/l peptidkoncentrációban sem. Jóllehet a II-es típusú PKA és a kalcineurin eloszlása az AKAP 79-en és az FKBP-12-n hasonló, a közöttük levő különbségeknek funkcionális jelentőségük van: az FK506 (2 $\mu\text{mol/l}$) nem érinti a gátlás potenciáját és a rekombináns AKAP 79 nem mutat peptidil-proli-izoméráz-aktivitást egy fluoreszcens peptid szubsztráttal szemben. Emellett a kalcineurin B alegység, amely ahhoz kell, hogy az FK506/FKBP kölcsönhatásba lépjen a kalcineurin A alegységgel, nem szükséges ahhoz, hogy az AKAP 79 kölcsönhatásba lépjen a kalcineurin A alegységgel. Emellett, míg az FK506/FKBP kalcineurin A-val való kölcsönhatása kalcium/kalmódulin dependens, a kalcineurinaktivitás AKAP 79-cel való gátlása kalcium/kalmódulin independens. Ezeket a megfigyeléseket összegezve azt mondhatjuk, hogy a kalcineurint inaktív állapotban az AKAP 79 lokalizálja, a rögzítőfehérjéhez kötött PKA-val analóg módon.

3. példa

Ebben a példában a II-es típusú PKA és a kalcineurin szubcelluláris eloszlását mutatjuk be különböző szövetekben.

Számos fehérjekináz és fehérjefoszfatáz szubcelluláris lokalizációját a célzó alegységekkel való asszociációval határozzuk meg. Az AKAP 79 a szabályozó fehérjék ezen osztályának egy új tagja, mivel bifunkciós szerepet játszik mind a PKA-nak, mind a kalcineurinnek a lokalizálásában.

A sejteket tenyésztjük, formalinnal fixáljuk, majd immunológiai módszerrel festjük [Rosenmund és munkatársai: Nature 368, 853–856 (1994)]. Az RII festéséhez FITC-vel konjugált antikecske szekunder antiszérumot használunk. A kalcineurin festéséhez biotinilezett antinyúl szekunder antiszérumot és sztreptavidin Texas-Red-et (Jackson) használunk. A képeket egy Biorad MRC-600 konfokális lézer letapogató rendszerrel kapjuk meg (A1 és A2 szűrők), egy Nikon optifot 2 mikroszkóppal, amely 60x planapokromát (1.6 NA) olajimmersion objektívvel van felszerelve. A konfokális szekciók 1,5 és 2 μm abszolút vastagságban találhatók.

Az AKAP 79 homológokat szarvasmarha-, sertés-, nyúl- és rágcsálógyanban figyeltük meg. Ez azt mutatja, hogy a PKA és a kalcineurin kolokalizációja általános jelenség, amely a neuronokat a specifikus szignál transzdukciós eseményekhez adaptálja. Immunocitokémiai módszerek alkalmazásával a II-es típusú PKA és a kalcineurin eloszlását vizsgáljuk tenyésztett hippocampális neuronokban. Az RII (zöld jelzés a 2A. ábrán) és a kalcineurin (vörös jelzés a 2B. ábrán) festési mintázata regionálisan diszpergálódik, és átfed a neuritokban (az RII vörös, a kalcineurin zöld a 2C. ábrán). Ezek a megfigyelések megfelelnek a II-es típusú PKA és a kalci-

neurin rögzítőfehérjével való kolokalizációjának, és azt sugallják, hogy a hármas komplex szerepet játszik a szinaptikus transzmisszió szabályozásában. Ez egybeesik azokkal a kísérletekkel, amelyek az RII és az AKAP 79 kolokalizációját igazolják ezekben a sejtekben, valamint azokkal a vizsgálatokkal, amelyek azt mutatják, hogy az AKAP 79, a II-es típusú PKA és a kalcineurin a poszt-szinaptikus sűrűsödések komponensei. A lokalizált hármas transzdukciós komplex potenciális szubsztrátjai lehetnek az AMPA/kainát receptorok, amelyeket a rögzítőfehérjével célzott PKA modulál.

4. példa

Ebben a példában az AKAP 79 és a kalcineurin kölcsönhatását mutatjuk be kettős élesztő hibrid vizsgálatokban. Az AKAP 79-et használva „csaliként” az egy T-sejt-könyvtárból származó cDNS által kódolt kalcineurinról kiderült, hogy kötődik az AKAP 79-hez.

A vizsgálatot lényegében Durfee és munkatársai módszerével végezzük [Genes and Development 7, 555–567 (1993), amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk]. A „célpont” és a „csali” két plazmid volt, mindegyik tartalmazza a Gal–4 transzkripció faktor egy részét. A „csali” plazmid (pAS1) egy 2 mikronos alapú plazmid volt egy ADH promoterral, amely a GAL–4 DNS-kötő alegységhez kötődik [1–147-es aminosavak; Keegan és munkatársai: Science 231, 699–704 (1986), amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk], majd ezt követi egy hemagglutinin (HA) címke, egy poliklonális hely és egy ADH terminátor. A szelekciót SC–Trp táptalajjal tartjuk fenn. A „célpont” konstrukció egy leu 2,2 mikronos alapú plazmid, amely tartalmaz egy ADH promotert és egy terminátort a Gal–4 transzkripció aktivációs II-es doménnel [768–881-es aminosavak; Ma és Ptashne: Cell 48, 847–853 (1987), amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk], majd ezt követi egy többszörös klónozóhely. Ezt a vektort, a pACT-t használjuk egy egér-T-sejt cDNS fúziós könyvtár készítésére. A szűrővizsgálatban használt *Saccharomyces cerevisiae* y190 törzs (ATCC 96400; Harper et al.: Cell 75, 805–816, 1993) genomjába integrálódva két riportergént tartalmaz. A riportergének egy Gal–1 promoter szabályozása alatt állnak, amely Gal–4 kötőhelyeket tartalmaz. Ha a csaliplazmid és a célpontplazmid által kódolt fehérjék asszociálódnak, akkor a Gal–4 transzkripció faktor alegységei összejönnek, és a riportergének transzkripcióját iniciálják.

Az AKAP 79 kódolórégióját tartalmazó 1,3 kilobázis méretű NcoI/BamHI fragmenst egy pET11d gerincből izoláltuk, és a pAS1-hez ligáltuk, hogy a szűrővizsgálatban „csaliként” működjön. Ebből a konstrukcióból egy µg-ot y190 MATa-ba és y190 MATα-ba transzformálunk, egy standard lítium-acetát-PEG transzformációs protokollt alkalmazva. Minden egyes mating típusból négy izolátumot (y190A pAS1 AKAP 79 1–4 és y190α pAS1 AKAP 79 1–4) vizsgálunk meg, hogy képesek-e kölcsönhatásba lépni egy pACT-RII fúziós konstrukcióval, amely tartalmazza a PKA szabályozó alegységét (az RII 1–89-es aminosavai). Ezt úgy értük el, hogy a törzse-

ket YEPT táptalajon (1 százalék Bacto élesztőkivonat, 2 százalék Bacto pepton, 2 százalék szacharóz és 2% Bacto agar) keresztezzük éjszakán át 30 °C-on, majd diploidokat szelektálunk SC-Leu-Trp lemezekeken. Az *Escherichia coli* lac Z génnek, amely riportergékként működik, azután vizsgálhatjuk a β-galaktozidáz-aktivitását. A keresztezett törzseket azután SC-Leu-Trp lemezeken replikázzuk, amelyeket Hybond–N (Amersham) szűrőlapokkal rétegzünk le és éjszakán át növesztünk. A szűrőlapokat cseppfolyós nitrogénbe tesszük egy percre, hogy feltörjük az élesztősejteket. Egy 3MM papirkorongot teltünk körülbelül 3 ml 0,1% X-gal-lal, amely egy 40 mmol/l NaH₂PO₄, 60 mmol/l Na₂HPO₄, 10 mmol/l KCl és 10 mmol/l MgSO₄ összetételű oldatban van oldva. A lizálélesztő-szűrőlapot a korongra tesszük, és hagyjuk hogy 30 °C-on kifejlődjön, körülbelül 1-2 óra hosszat. A mind a pAS1 AKAP 79-et, mind a pACT-RII fúziókat tartalmazó diploidtörzsek pozitívak a β-galaktozidáz-aktivitás szempontjából, amit az mutatott, hogy az élesztő helye kék színű lett. Kontrollként a csali AKAP 79 plazmid fehér maradt, ha egy üres pACT kontrollal kereszteztük.

A Gal–4 AKAP 79 fúziós fehérje kimutatását úgy hajtuk végre, hogy az y190A AKAP 79-et (1-es és 2-es izolátumok) 2×10⁷ sejt/ml sűrűségig növesztjük 50 ml SC–Trp táptalajon. A sejteket ülepítjük (3000×g, 10 perc), majd 200 µl üvegyönggyel lizáljuk (mértük: 425–600 mikron) 25 mmol/l TRIS pH=8, 5 mmol/l EDTA, 5 mmol/l EGTA, 2 mmol/l O-fenantrólin, 1 mmol/l DTT, 25 µmol/l 4-(2-amino-etil)-benzolszulfonil-fluorid-HCl, (molekulásúlya 239,5 AEBSF), 1 mmol/l benzanidin, 1 µg/ml PLACC (pepszatin, leupeptin, aprotinin, kalpain I és II) és 20 µg/ml benstantin lizálópuffer összetételű pufferben. Egy másik módszer szerint a sejteket egy percig vortexeljük, majd egy percre jégre tesszük, 12-szer megismételve ezt a ciklust. A fehérje koncentrációját meghatározzuk, és 30 µg összfehérjét viszünk fel 10%-os SDS–PAGE géltre. A gél immobilon-P-re (Millipore) visszük át, majd standard eljárásokkal kimutatjuk, egy 12CA5 jelű anti-HA monoklonális ellenanyag (Bab Co., Berkeley, CA) és kecske antiégér IgG alkalikus foszfatázhoz konjugált szekunder antiszérum (Biorad, Hercules, CA) alkalmazásával. Egy körülbelül 100 kDa méretű Gal–4 AKAP 79 fúziós fehérjét könnyen ki lehetett mutatni, jelezve ezzel, hogy ezekben a törzsekben jelen van a megfelelő méretű termék.

Az y190A pAS1 AKAP 79 izolátumot választottuk ki egy pACT rácsáló T-sejt cDNS könyvtár átvizsgálására. Egy 500 ml-es SC–Trp tenyészetet (OD₆₀₀=0,6–0,8) állítunk elő, a sejteket kinyerjük, desztillált vízzel mossuk, majd újra ülepítjük. Az üledéket 50 ml LiSORB-ban vesszük fel (100 mmol/l lítium-acetát, 10 mmol/l TRIS pH=8, 1 mmol/l EDTA pH=8,1 mol/l szorbit), átvisszük egy egyliteres lombikba, majd 30 percig 30 °C-on rázatjuk 220/perc fordulatszámmal. A sejteket utána ülepítjük, és újra szuszpendáljuk 625 µl LiSORB-ban és jégen tartjuk, ameddig a DNS-t előállítjuk.

A transzformáláshoz a DNS-t úgy állítjuk elő, hogy 400 µl 10 mg/ml lazacsperma DNS-t forralunk 10 percig, majd 500 µl LiSORB-ot adunk hozzá, és hagyjuk

lassan szobahőmérsékletre hűlni. A Mu T-sejt könyvtár-
ból származó DNS-t (40–50 µg) adunk hozzá egy
1 mg/ml törzsoldatból. A jégen tartott élesztőtenyészet
10 Eppendorf-csőbe osztjuk szét, 120 µl preparált
DNS-sel. A csöveket 30 °C-on inkubáljuk 220/perc
fordulatszámmal. 30 perc elteltével 950 µl 40%-os
PEG₃₃₅₀-et (100 mmol/l Li-acetát, 10 mmol/l TRIS
pH=8, 1 mmol/l EDTA pH=8 oldatban) adunk minden
egyed tenyészethez, majd további 30 percig inkubáljuk.
A mintákat azután egyesítjük, és egy kis aliquot részt el-
távolítunk belőle, hogy vizsgáljuk a transzformáció ha-
tékonyságát, majd SC-Leu-Trp lemezekre szélesztjük.
A megmaradt sejteket 100 ml SC-Leu-Trp-His táptalaj-
hoz adjuk, majd 1 óra hosszat 30 °C-on növesztjük
220/perc fordulatszámmal rázatva a tenyészetet. A ki-
nyert sejteket 5,5 ml SC-Leu-Trp-His+50 mmol/l 3AT
(3-amino-triazol) összetételű közegben szuszpendáljuk,
és 300 µl-es aliquot részeket szélesztünk 150 mm-es le-
mezekre, amelyek SC-Leu-Trp-His+50 mmol/l 3AT
összetételű táptalajt tartalmaznak, majd hagyjuk egy hé-
tig 30 °C-on szaporodni.

Négy nap elteltével a titerlemezeket megszámláljuk
és $1,1 \times 10^5$ telepet átvizsgálunk. Nagyméretű β-galaktó-
zidáz vizsgálatokat végzünk a könyvtár lemezein, majd
tíz pozitív klónt izolálunk egyedi telepekből. Ezek közül
a telepek közül az egyik lényegesen nagyobbra nő, mint
a többi, ez kapta a 11.1 klón jelzést. Ezekből a törzsekből
összélesztő DNS-t állítunk elő, majd leu2 plazmid DNS-t
izolálunk. A „kimentett” plazmidot használjuk az eredeti
y190A pAS1 AKAP 79 csaltörzs és az y190a újra transz-
formálására. A β-galaktozidáz-vizsgálatban csak a 11.1-
es klón maradt pozitív az y190ApAS1 AKAP 79-ben.
A pACT 11.1-es klónt tartalmazó y190a fehér maradt, ez
a negatív kontroll.

Az XhoI endonukleázzal végzett restrikciós emész-
téssel egy 2,3 kilobázis méretű inszert szabadul fel, és a
plazmidot mind előre, mind hátrafelé megszekvenáljuk.
A Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kittel
(Applied Biosystems, Inc. Foster City, CA) a szimmetri-
kus polimeráz-láncreakció alkalmazásával kétszálú
templátokon kapott reakciókat elemezzük egy ABI
373A automatizált szekvenálóval (Applied Biosystems,
Inc.). A 11.1-es klónból származó szekvenciában talál-
ható egy 487 aminosav hosszúságú nyitott leolvasási ke-
ret (6. számú szekvencia), amely helyesen fuzionál a
pACT Gal-4 aktivációs doménjével. Az NIH szekven-
cia adatbázisát átvizsgáltuk, és kiderült, hogy a szekven-
cia nagyon erős homológiát mutat a humán kalmo-
dulindependens fehérjefoszfátázal a kalcineurinnal.
A 11.1-es klón és a humán A1 izoforma közötti számító-
gépes elemzés azt mutatja, hogy 80%-os azonosság van
a nukleinsavszinten és 93%-os azonosság van az ami-
nosavszinten (3. ábra). A humán szekvenciában levő
első 10 aminosav és egy 18 aminosavas inszert nem ta-
lálható meg az egér 11.1-es szekvenciájában. A 11.1-es
klón szoros rokonságban áll az egér kalcineurin A β-
szekvenciájával, de a C-terminálison jelentősen eltér
tőle. Hasonlóképpen, a humán kalcineurin A1 és a hu-
mán kalcineurin A2 izoforma erős homológiát mutat,
de erősen eltérnek egymástól a 3'-végükön.

Az AKAP 79-kalcineurin kölcsönhatás-specifikus-
ságát úgy igazoljuk, hogy a kalcineurin pACT-t tartal-
mazó törzset egyéb, nem rokon csaltörzsekkel keresz-
tezzük. A keresztezéseket az előzőekben ismertetett mó-
don végezzük, a pAS1-et az RII-höz (1–89), a kazeinki-
náz 1-hez, a foszfodiészteráz 32-höz (HDUN2) és az
AKAP Ht31-hez fuzionáltatva tartalmazó törzsekkel.
A β-galaktozidáz-aktivitás mindegyik említett diploid-
törzsben negatív volt.

5. példa

Ahhoz, hogy kiértékeljük az AKAP 79 kölcsönhatá-
sát a 11.1-es klónnal, egy sorozat kalcineurin 11.1 delé-
ciós mutánszt készítettünk, és mindegyik plazmidot meg-
vizsgáltuk a dihibridrendszerben.

Ugyanazt az 5'-oligonukleotidot (MH47) és négy
3'-oligonukleotidot (MH48, MH49, MH50 és MH51)
használva, PCR-reakciókat állítottunk össze, hogy
amplifikáljuk a kalcineurin 11.1-et kódoló aminosav-
akat, az 1–104-et, az 1–2024-et, az 1–312-t és az
1–400-at. Ezeket a fragmenseket BglII restrikciós endo-
nukleázzal emésztjük, majd pACT-be klónozzuk. Az
orientációt restrikciós emésztési térképezés alapján erő-
sítjük meg, a PCR hibáit pedig automata szekvenálással
határozzuk meg. Azokat a plazmidokat amelyek helye-
sen kódolják a keresett deléciós mutánszt, y190MATa és
y190MATα törzsekbe transzformáljuk. Az élesztő-
törzseket y190apAS1 és y190aPAS1 AKAP 79 törzsek-
kel keresztezzük, az eredeti pACT 11.1-gyel, amely
1–478 aminosavakat kódolja a 6. számú szekvenciá-
ban. A kapott keresztezési szűrőt az előzőekben ismerte-
tett módon vizsgáljuk meg, és az figyelhető meg, hogy
csak azok a fúziós fehérjék képesek a riportergének
transzkripcióját beindítani, amelyek vagy az 1–400
vagy az 1–487-es aminosavakat kódolják. Az a megfi-
gyelés, hogy az 1–312-es aminosavakat tartalmazó fú-
ziós fehérje nem képes a transzkripció iniciációjára, azt
mutatja, hogy az AKAP 79 kötéshez a 313–400-as cso-
portok közötti aminosavakra van szükség. Erről a
régioról korábban kimutatták, hogy tartalmazza az
FKBP/FK506 kötő domént, valamint a kalcineurin B
kötő régiót [Husi és munkatársai: Journal of Biological
Chemistry 269, 14 199–14 204 (1994)].

Ahhoz, hogy pontosabban meghatározzuk az AKAP
79 megkötéséhez szükséges kalcineurin aminosavsze-
kvenciákat, további deléciós mutánsokat készítettünk és
vizsgáltuk az AKAP 79-hez való kötődésüket. Olyan
expressziós konstrukciókat készítettünk a pACT fel-
használásával, amelyek a kalcineurin 11.1 332–441-es,
332–487-es és 442–487-es doménjeit kódolják. Csak-
úgy, mint az előzőekben, minden egyes konstrukciónak
meghatározzuk a szekvenciáját, a pAS1 AKAP 79-be
való transzformálás előtt, hogy a helyes mutánszt exp-
resszáljuk.

A transzformáció után azonban nem volt kimutatha-
tó riportergén-expresszió, ami azt mutatja, hogy a mu-
tánsok nem képesek kölcsönhatásba lépni az AKAP
79-cel. Az AKAP 79 kötés hiányára az egyik lehetsé-
ges magyarázat az, hogy ezeknél a csonkított klónoknál
elvesztett a kötéshez szükséges szekunder fehérjeszerke-

zet, vagy az, hogy néhány N-terminális aminosavszekvenciára is szükség van a kötéshez.

6. példa

Ahhoz, hogy megpróbáljuk pontosabban meghatározni az AKAP 79-nek a kalcineurin 11.1-hez való kötődése régióját, további, deléciós mutációkat hordozó plazmidokat készítünk, amelyek eltérnek az előzőekben említettektől, vagy pontmutációkat készítünk.

A) Terminális deléciók

Ebben a példában azt igazoljuk, hogy az AKAP 79 és a kalcineurin 11.1 közötti kölcsönhatáshoz a 30–336 kalcineurin aminosavrégióra van szükség. Röviden, primereket terveztünk, a kalcineurin 11.1 különböző régióira a polimeráz-lánreakciókban való felhasználás céljából, hogy specifikus N-terminális és C-terminális deléciókat állítsunk elő, amelyeket az 1. táblázatban ismertetünk. A PCR-termékeket úgy állítjuk elő, hogy a 3' és 5' primerekből 1-1 µg-ot keverünk össze az egyes dNTP-ekből 200-200 µg-mal és 1 ng plazmid templáttal, a #2 PCR-pufferben (összetétele: 20 mmol/l TRIS-HCl pH=8,75, 10 mmol/l KCl, 10 mmol/l (NH₄)₂SO₄, 2 mmol/l MgSO₄, 0,1% Triton X-100 és 100 µg/ml BSA) (Stratagene), majd hozzáadunk 2,5 egység *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) DNS-polimerázt (Stratagene) 100 µl ösztérfogóban. Harminc ciklust hajtunk végre: egy perc 95 °C, két perc 50 °C és négy perc 72 °C. Az amplifikációs termékeket megtisztítjuk és a pACT BgIII hasítási helyére klónozzuk. A kapott konstrukciókban az előzőekben ismertetett módon szekvenálással megvizsgáljuk a PCR-hibákat és az orientációt.

Mindegyik konstrukciót egyenként transzformáljuk y190α, y190a pAS1 APAK 79 és y153b pAS1 AKAP

79 élesztőtörzsekbe, amelyeket az előzőekben, a 4A. példában ismertetünk, majd β-galaktózidáz szűrővizsgálatokat végzünk, az előzőekben ismertetett módon. Az első, C-terminális deléciókat kódoló vektorcsoporttal kapott eredmények alapján meghatározható egy terület a 312–400-as aminosavak között, amely az AKAP 79 kötődéshez szükséges. Az y153b pAS1 APAK 79 transzformánsokból kapott pozitív szűrővizsgálati eredmények is megerősítették, hogy az AKAP 79 kötődéshez nincs szükség a kalcineurin B-re.

Az előző vizsgálatok azt mutatták, hogy a kalcineurin B kötődéséhez a 348-as, 349-es, 355-ös és 356-os aminosavakra van szükség [Watanabe és munkatársai: *Journal of Biological Chemistry* 270, 456–460 (1995)], a kalcineurin autoinhibíciós domén a 442–487-es aminosavakat tartalmazza, az FKBP/FK506 kötéséhez pedig a 350-es, 353-as és 359-es aminosavakra van szükség [Kawamura és Su: *Journal of Biological Chemistry* 270, 15 463–15 466 (1995)]. További kalcineurin 11.1 konstrukciók, amelyek további C-terminális deléciókat kódolnak, azt mutatják, hogy a kalcineurin 11.1/AKAP 79 kötéshez szükség van az 1–336-os aminosavakra. Ezek a deléciók azt mutatják, hogy a kalmodulint kötő domén, az autoinhibíciós domén és a kalcineurin B-t kötő domén nem szükséges ahhoz, hogy az AKAP 79 és a kalcineurin A komplexet képezzen.

Minden delécióra vonatkozó kötési eredmény az 1. táblázatban található. Az aminosavdeléciók azt mutatják, hogy az AKAP 79 kötéshez szükséges legalább egy terület a 30–99-es csoportok között található. Csak úgy, mint az előzőekben, az N-terminális deléciókat expresszáló y153b pAS1 AKAP 79 transzformánsoknál nincs szükségük kalcineurin B-re a kötéshez.

1. táblázat

Az AKAP 79/immunofilin kötődés a kalcineurin deléciós mutánsokhoz

Kalcineurindeléció (az expressziós plazmid készítéséhez használt primerek* alapján jelölve)	Aminosavszekvencia	AKAP 79	Immunofilinkötés
MH52–MH58	1–487	+	N. D.
MH52–MH48	1–400	+	N. D.
MH52–MH49	1–312	–	N. D.
MH52–MH50	1–204	–	N. D.
MH52–MH51	1–104	–	N. D.
MH66–MH58	332–487	–	N. D.
MH59–MH58	441–487	–	N. D.
MH66–MH57	332–441	–	N. D.
MH52–MH75	1–375	+	+
MH52–MH74	1–354	+	–
MH76–MH75	30–375	+	+
MH77–MH75	98–375	–	–
MH52–MH93	1–347	+	N. D.
MH52–MH94	1–340	+	N. D.
MH52–MH95	1–330	–	N. D.
MH52–MH96	1–320	–	N. D.

1. táblázat (folytatás)

Kalcineurindelécio (az expressziós plazmid készítéséhez használt primerek* alapján jelölve)	Aminosavszekvencia	AKAP 79	Immunofilinkötés
MH52–MH107	1–338	+	N. D.
MH52–MH108	13367	+	N. D.
MH52–MH109	1–334	–	N. D.
MH52–MH110	1–332	–	N. D.
MH52–MH111	1–335	–	N. D.

*: Az expressziós plazmidok készítésére használt primerek

MH48 (10. számú szekvencia): 5'-GTATTAGCAGGAGATCTTCTACTTC-3'
 MH49 (11. számú szekvencia): 5'-GTGTGTGTAGATCTGGTGAAAGT CC-3'
 MH50 (12. számú szekvencia): 5'-ATTGTAGAGATCTAAGTAATTAGGTGCCG-3'
 MH51 (13. számú szekvencia): 5'-GCCAATTGCTCAGATCTTGTTCCTTATG-3'
 MH52 (14. számú szekvencia): 5'-GGAATTCCGATCCTCGAGAGATCTCGCCG-3'
 MH57 (15. számú szekvencia): 5'-CCACTTTGAGATCTCTACCGTCTCCAGCC-3'
 MH58 (16. számú szekvencia): 5'-CCCTGAGATCTTCAGCTGCTAAGAC-3'
 MH59 (17. számú szekvencia): 5'-GGCTGAGATCTGGCAGACCTTGCAAAGTGG-3'
 MH66 (18. számú szekvencia): 5'-GTGATGAAGATCTTACAGTTAATTGCTCTCC-3'
 MH74 (19. számú szekvencia): 5'-TTCTCCAGATCTTGGTAAGGACCATG-3'
 MH75 (20. számú szekvencia): 5'-CACCTTCTGTAGATCTTTCATCATCAGAAC-3'
 MH76 (21. számú szekvencia): 5'-CATCGGCAGATCTCTGAAGAAGTG-3,
 MH77 (22. számú szekvencia): 5'-CCATGGCCAATTTTAGATCTCGATGAAAC-3'
 MH93 (23. számú szekvencia): 5'-GGACCATGAGATCTAATCCATAAAATTGGG-3'
 MH94 (24. számú szekvencia): 5'-AAATGGGAGATCTAATAAGGATGTGGAGAGC-3'
 MH95 (25. számú szekvencia): 5'-GGAGAGCAATTAAGATCTAAATGTTTCATCAC-3'
 MH96 (26. számú szekvencia): 5'-TTTTCATAGATCTATAACAAGCAGTTT-3'
 MH107 (27. számú szekvencia): 5'-CAACCAGATCTAATGTGGAGAGCAATTAACCTGTCG-3'
 MH108 (28. számú szekvencia): 5'-CCAATAAGAGATCTAAGAGCAATTAACCTGTCG-3'
 MH109 (29. számú szekvencia): 5'-TGTGAGATCTAATTAACCTGTCGAATGTTTCATCAC-3'
 MH110 (30. számú szekvencia): 5'-GGAGAGCAGATCTACTGTCGAATGTTTCATCAC-3'
 MH111 (31. számú szekvencia): 5'-AAGGATAGATCTAGCAATTAACCTGTCGAATGTTTCATCAC

B) Pontmutációk

Ahhoz, hogy pontosan ki tudjuk értékelni, hogy melyik aminosav vesz részt az AKAP 79 kötésében, PCR-alapú stratégiával kalcineurin 11.1 pontmutációkat hoztunk létre. Három alaninmutást (Cys³³⁵→Ala Ser³³⁶→Ala és Pro³³⁹→Ala) hoztunk létre, és vizsgáltuk az AKAP 79 kötését befolyásoló tulajdonságait a dihibridrendszerben. Ezek közül a mutánsok közül egyik sem akadályozta meg, hogy az AKAP 79 megkösse a kalcineurint, jelezve ezzel, hogy csak ezeknek a csoportoknak a módosítása nem elegendő ahhoz, hogy elrontsuk az AKAP 79 kötődését.

7. példa

További szűrővizsgálatokat végeztünk a pACT Mu T-sejt könyvtár DNS-ével és a pASi AKAP 79 csalitörzssel, hogy azonosítsunk egyéb AKAP 79 kötő fehérjéket az előzőekben ismertetett protokollal. A körülbelül 211,000 telep átvizsgálásával egy pozitív klónt kaptunk (jele pACT 2–1), amely a kimentés és a retranszformáció során is stabil maradt. A plazmidból XhoI emésztéssel eltávolítjuk a könyvtárszekvenciát, amelyről kiderült, hogy egy 1200 bázispár méretű inszert. A szekvenálásból és az azt követő adatbázis-kutatásból kiderült,

hogy a klón 91%-os azonosságot mutat a patkány fehérjékinéz A 1α típusú szabályozó alegységével (RI).

A könyvtárat újból átvizsgáltuk ugyanazt az AKAP 79 csalit használva, és körülbelül 520,000 transzformánsból tizenöt pozitív klónt mutattunk ki. Ebből a tizenötötől tizenegyről derült ki, hogy a patkány PKA I-es típusú szabályozó alegységével homológ. Mindegyik izolátumot az RI 5' nem transzlálódó régiójához fuzionáltatjuk, és az iniciálós metioninon keresztül nyitva maradt. A restrikciós emésztési elemzések és szekvenálási adatok alapján kilenc klónt izoláltunk, beleértve az eredeti pACT 2–1 izolátumot is.

Ezek az eredmények az első igazolásai egy olyan rögzítőfehérjének, amely a PKA-nak mind az RII, mind az RI szabályozó alegységéhez kötődik, ami váratlan, a két alegység egymástól eltérő primer struktúrája miatt.

Ahhoz, hogy tovább definiáljuk a kölcsönhatás szekvenciáját az RI és az AKAP 79 között, és hogy meghatározzuk, vajon a kölcsönhatás az AKAP 79-re jellemző csak, új élesztőtörzseket fejlesztettünk ki. Az RI első 400 bázispárjában található egyik BglII hasítási hely felhasználásával egy, az 1–80-as aminosavakat kódoló fragmenst izoláltunk a pACT72-ből és a pAS1-be, valamint a pACT-be ligáltuk. Az orientációt restrikciós enzi-

mes emésztéssel határoztuk meg. Standard élesztőttranszformációs eljárások alkalmazásával a plazmid DNS-t y190 MAT a-ba juttattuk be, majd a transzformált élesztőnek vizsgáltuk a β -galaktozidáz-aktivitását. A csonkított RI fúziós termékről kiderítettük, hogy nem képes a riporter gén expressziójának kiváltására. A transzformált törzseket azután egy sorozatkísérletben használtuk annak meghatározására, hogy a csonkított RI képes-e kölcsönhatásba lépni az AKAP 79-cel.

A kétszeresen transzformált élesztőtörzsekben megfigyelhető a riporter gén expressziója, jelezve, hogy az RI/AKAP 79 kötődés az RI első 80 aminosaván keresztül jön létre.

Végezetül, egy kísérletben, amelynek az volt a célja, hogy eldöntse, hogy a mind az RII-höz mind az RI-hez való kötődés képessége csak az AKAP 79-re jellemző-e, humán tiroid AKAP-ot [Carr és munkatársai: *Journal of Biological Chemistry* 267, 13 336–13 382 (1992)], amely a pACT Ht31 génterméke, a dihibrid szűrővizsgálati rendszerben vizsgáljuk az előzőekben ismertetett csonkított RI peptiddel, amely az 1–80-as aminosavakat tartalmazza, a pAS(1–80) plazmidon kódolva. A megfigyelt Ht31/RI kötődés, kombinálva a korábbi megfigyelésekkel, hogy a Ht31 megköti az RII-t, azt mutatja, hogy a rögzítőfehérjének az RI-hez és RII-höz egyszerre való kötődése nemcsak az AKAP 79-re jellemző.

8. példa

Annak a ténynek a fényében, hogy az AKAP 79-ről kimutattuk, hogy a PKA-nak mind az RI, mind az RII alegységéhez kötődik, egy szcintillációs „proximity” szűrővizsgálati technikát fejlesztettünk ki, azzal a céllal, hogy azonosítsuk azokat a specifikus inhibitorokat, amelyek tönkreteszik a PKA lokalizációját, zavarva az AKAP 79-nek a PKA-hoz való kötődését.

Először egy tioredoxin (TRX)-AKAP 79 fúziós fehérje expressziós plazmidot állítunk elő [LaVallie és munkatársai: *Biotechnology* 11, 187–193 (1993)]. Röviden, egy XbaI/HindIII tioredoxin fragmenst szubklónozzunk pUC19-be (ATCC 37254; Yanisch–Perron et al.: *Gene* 33 (1), 103–119, 1985), amely a lacZ gént és a tacZ promotert tartalmazza. A kapott plazmid jelzése TRX F/S pUC19. Ahhoz, hogy egy AKAP 79-et kódoló szekvenciát építsünk be a TRX F/S pUC19-be, egy NcoI hasítási helyet hozunk létre egy oligonukleotiddal (32. számú szekvencia), amely terminális SpeI és HindIII szekvenciákat tartalmaz. SpeI/HindIII emésztés után az oligonukleotidot beépítjük a vektorba, majd egy NcoI/XhoI fragmenst, amely az AKAP 79-et kódolja, a tioredoxin génnel leolvasási fázisban ligálunk. A fúziós fehérjét bármely *Escherichia coli*-ban – amely alkalmas rekombináns fehérjék kifejezésére – expresszáljuk, majd 96 lyukas ScintiStrip lemezekre immobilizáljuk (Wallac, Turbu, Finnország), amely a szilárd hordozóba bevitt szcintillátort tartalmaz. A lemezeket egy nyúl antiégér ellenanyaggal előre beborítjuk, amit arra használunk, hogy a TRX-re specifikus egér monoklonális ellenanyagot immobilizáljunk vele. A TRX-AKAP 79 fúziós fehérjét azután a lemezekkel befogjuk, az anti-TRX ellenanyaggal, és ^3H -RII-t adunk a le-

mezekhez a referencia inhibitor (például jelzetlen RII) jelenlétében vagy távollétében. Ha a ^3H -RII kötődik az AKAP 79-hez, akkor a jelzés elég közel kerül a hordozóba bevitt szcintillátorhoz, az ennek eredményeképpen létrejövő emissziót egy MicroBeta szcintillációs számlálóval határozzuk meg.

Az ebből a vizsgálatból származó eredmények azt jelzik, hogy a jelzetlen RII és az előzőekben ismertetett Ht31 peptid képes gátolni az AKAP 79/RII kötődését 1 mol/l és 50 nmol/l IC_{50} -értékkel. Ezek az eredmények hasonlóak azokhoz az eredményekhez, amelyeket egyéb rögzítőfehérjékre közöltek [Carr és munkatársai: *Journal of Biological Chemistry* 267, 13 376–13 382 (1992)]. A prolin helyettesítést tartalmazó Ht31 peptid, amelyet szintén ismertettünk az előzőekben, nem blokkolja az AKAP 79/RII kötődést. Mivel ezek az eredmények illeszkednek azokhoz, amelyeket a korábbi Western-blotoknál és felülrétegzési vizsgálatoknál figyeltünk meg, azt feltételezzük, hogy ez a technika lehetővé teszi az AKAP 79/RII kötés potenciális inhibitorainak, valamint az AKAP 79 egyéb ismert fiziológiai partnerekhez (például kalcineurin és proteinkináz C) való kötődése inhibitorainak gyors szűrővizsgálatát.

9. példa

Ezzel a példával azt igazoljuk, hogy a PKA-nak egy rögzítőfehérjével való asszociációja T-sejtekben befolyásolja a PKA aktivitását az NFAT-aktiválásra, ezzel modulálva az interleukin–2-termelődést.

Az interleukin–2 gének expressziója szorosan kapcsolódik a T-sejt-inaktiváláshoz. Az interleukin–2-transzkripciót PMA-val és ionomicinnel való aktiválás után tanulmányoztuk. Erről a két ágensről ismert, hogy potenciálják a proteinkináz C-t és a kalcium szekunder hírvívő válaszokat (beleértve a kalcineurin aktiválását). A proteinkináz C aktiválja a Ras-Raf-1-Mek-MAP kináz bioszintézis utat, amely részt vesz az NFAT nukleáris komponense indukálásában. A megnőtt kalciumkoncentráció aktiválja a kalcineurint, amely viszont aktiválja az NFAT citoplazmatikus komponensét, ezzel lehetővé teszi a sejtmagba való transzlokációt. Az NFAT komponenseknek ez az aktiválása indukálja az interleukin–2 gén expresszióját. A transzkripció mennyiségi meghatározásához egy transzformált Jurkat T sejtvonalat (NFATZ) (Fiering et al.: *Genes Dev.* 4, 10, 1823–1834, 1990) stabilan transzfektálunk egy olyan vektorral, amely az NFAT-kötő hely 3 egymás utáni példányát tartalmazza, valamint a minimális interleukin–2 promotert, a β -galaktozidázt (β -gal) kódoló lacZ génhez fuzionáltatva. Az interleukin–2-transzkripció mennyiségi meghatározását a β -galaktozidáz-aktivitás fluoreszcenciával aktivált sejtosztályozó (FACS) elemzésével végezzük. (NFAT egy transzkripciós faktor: nuclear factor of activated T cells.)

Tipikus esetben 1×10^6 NFATZ sejtet (1 ml tenyésztő táptalajban) 60 percig 37°C -on előinkubálunk különböző koncentrációjú ciklosporinnal és mirisztilzett peptidokkal, beleértve az AKAP 75 81–108-as aminosavait [8. számú szekvencia; Glantz és munkatársai: *Journal of Biological Chemistry* 268, 12 796–12 804 (1993),

amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk]; a PKI-t (egy PKA inhibitor peptid; GRRNAIHDI; 5. számú szekvencia); és a Ht31 fehérje egyik peptidjét [9. számú szekvencia; a teljes hosszúságú Ht31 fehérje 493–515-ös aminosavai; Carr és munkatársai: *Journal of Biological Chemistry* 267, 13 376–13 382 (1992), amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk], amely peptidek blokkolják a rögzítőfehérje kölcsönhatását a PKA RII alegységével. Mindegyik peptidet mirisztilizzük Eichholtz és munkatársai leírása szerint [*Journal of Biological Chemistry* 268, 1982–1986 (1993)].

A ciklosporinnal, PKI-val (5. számú szekvencia) és egy Ht31 peptiddel (9. számú szekvencia) végzett kísérletekben a ciklosporinnal vagy a megfelelő peptidekkel való inkubálást egy újabb 30 perces inkubálás követi forskolinnal (25 $\mu\text{mol/l}$), valamint izobutil-metil-xantinnal (IBMX; 0,1 mmol/l). A forskolinnal/IBMX-szel végzett inkubálás megemeli az intracelluláris cAMP-koncentrációt (4. ábra), ezzel aktiválva a PKA-t. Végeztül forbol-12-mirisztát-13-acetátot (PMA, 10 ng/ml) és ionomicint (2 $\mu\text{mol/l}$) adunk hozzá, majd az inkubálást további 4 óra hosszat folytatjuk. A kontrollokat vagy csak PMA/ionomicinnel inkubáljuk, vagy forskolin/IBMX-szel és PMA/ionomicinnel, az előzőekben ismertetett körülmények között. A PMA/ionomicin inkubálás utolsó 20 percében 300 $\mu\text{mol/l}$ klorokint adunk hozzá, hogy gátoljuk az endogén lizoszomális β -galaktozidáz-aktivitást. A sejteket centrifugáljuk, majd 50 μl tenyésztő táptalajban szuszpendáljuk, amihez 50 μl fluoreszcein di(β -D-galaktopiranozid)-ot (FDG) adunk (0,1 mmol/l végkoncentráció; Molecular Probes). Ez az ozmotikusok-eljárás 75 másodpercig tart, mielőtt visszatérünk a sejtek izotóniás koncentrációjához, 1 ml hideg FACS-puffer (klorokint tartalmaz) hozzáadásával. A lacZ β -galaktozidáz-aktivitását áramlási citometriával mérjük, amit fluoreszceinelemzésre konfiguráltunk.

Az 5A–5H. ábrákon ennek a kísérletnek az eredményeit mutatjuk be. Az 5A. és 5B. ábrák FACS görbék, amelyek a vizsgálat háttér-fluoreszcenciáját mutatják, hozzáadott festékkel és anélkül. Az 5C. ábrán azt láthatjuk, hogy az NFATZ Jurkat-sejtek PMA/ionomicin kezelése 6–7-szeresére növeli a β -galaktozidáz-aktivitást. A ciklosporin teljesen eltörli ezt az aktivitást, ami várható a kalcineurinnak az interleukin-2-transzkripcióban játszott fontos szignálszerepe miatt (5D. ábra). A mirisztilzett AKAP 75 peptidről (8. számú szekvencia) kiderült, hogy ha 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban használjuk a táptalajban, akkor 40–50 százalékkal csökkenti a PMA/ionomicin által indukált β -galaktozidáz-aktivitást.

Az 5E. ábrán látható, hogy a forskolin és az IBMX körülbelül 50 százalékkal csökkenti a PMA/ionomicin által indukált β -galaktozidáz-aktivitást. Ezt a blokkot teljesen eltávolítja mind 100 $\mu\text{mol/l}$ mirisztilzett PKI peptid (5. számú szekvencia), mind 100 $\mu\text{mol/l}$ mirisztilzett Ht31 peptid (9. számú szekvencia) (5F. és 5G. ábra). Az 5H. ábrán látható, hogy ha a mirisztilzett Ht31 peptidben egy prolinhelyettesítés van, amelyről ismert, hogy a peptidet képtelenné teszi a PKA-rögzítés blokkolására, akkor ez nem érinti a forskolin/IBMX blokkadot. Ezek az eredmények a PKA, valamint a PKA egy rögzítőfehérjén keresztül való lokalizációjának fontosságát sugallják az interleukin-2 gén – expressziójában. Amint az előzőekben ismertetettük, a PKA-aktivitás vagy -lokalizálás zavarása használható az immunválasz fokozására, a T-sejtek aktiválására a szelektív klónexpanzióban, vagy a T-sejt-aktiválás korai eseményeinek vizsgálatára.

20 10. példa

Két további egyedi izolátumot, a pACT 59-et és a pACT 74-et azonosítottunk, amelyek egy másik fehérjének ugyanazt a régióját kódolják. Ezeknek a klónoknak a szekvenciáját a 33. és 34. számú szekvenciákban mutatjuk be. Az adatbázisok átvizsgálásával kiderült, hogy jelentős aminosavhomológia van három, ismeretlen funkciójú génnel: *C. elegans* (egy 319 aminosavat tartalmazó fehérje, azonosítója No. U00032 az adatbázis listájában) fehérje, humán magzati agyban expresszálandó szekvencia (97 aminosavból álló fehérje, azonosítója T08697), és egy HL60 által expresszált szekvencia (90 aminosavat tartalmazó fehérje, azonosítója D20731). Találtunk még homológiát egy *Saccharomyces pombe* géntermékkel, jele PAD 1+ (egy 308 aminosavból álló fehérje, azonosítója D31731), amelyről kimutatták, hogy a PAPI+-nak egy AP-szerű transzkripciósfaktornak a pozitív szabályozója.

Emellett két másik pozitív klónt mutattunk ki ebben a szűrővizsgálatban; pACT36, amely egy 143 aminosavból álló nyitott leolvasási keretet kódol, helyesen fuzionáltatva a Gal14-hez, és a pACT60, amely egy valamivel rövidebb régiót kódol, amely egy nyilvánvaló deleciónból származik. Ezeknek a klónoknak a szekvenciáit a 35. és 36. számú szekvenciákban mutatjuk be. A két izolátum eltér egymástól, és az NIH adatbázisban szereplő szekvenciák egyikével sem mutat azonosítást.

A szakterületen jártas szakemberek számos módosítást tehetnek az előzőekben ismertetett találmányban. Ezért csak a mellékelt igénypontok alapján lehet a találmány oltalmi körét meghatározni.

A szekvenciák jegyzéke

(1) ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓK

(i) BENYÚJTÓ: ICOS Corporation et al.

(ii) A TALÁLMA NY CÍME: A RÖGZÍTŐ FEHÉRJE FUNKCIÓ MODULÁTORAI

(iii) A SZEKVENCIÁK SZÁMA: 42

(iv) LEVELEZÉSI CÍM:

(A) CÍMZETT: S. B. G. & K. Patent & Law Office

(B) UTCA: Andrassy út 113

(C) VÁROS: Budapest

- (D) ÁLLAM:
 (E) COUNTRY: MAGYARORSZÁG
 (F) IRÁNYÍTÓSZÁM: H-1062
- (v) SZÁMÍTÓGÉPPÉL OLVASHATÓ FORMA:
 (A) HORDOZÓ TÍPUSA: Floppy disk
 (B) SZÁMÍTÓGÉP: IBM PC kompatibilis
 (C) OPERÁCIÓS RENDSZER: PC-DOS/MS-DOS
 (D) SZOFTVER: PatentIn Release #1.0, Version #1.25
- (vi) A JELEN BENYÚJTÁS ADATAI:
 (A) A BENYÚJTÁS SORSZÁMA: P 96 02311
 (B) A BENYÚJTÁS IDŐPONTJA: 1996. 08. 22.
 (C) OSZTÁLYOZÁS:
- (vii) AZ ELŐZŐ BENYÚJTÁS ADATAI:
 (A) A BENYÚJTÁS SORSZÁMA: US 08/503,226
 (B) A BENYÚJTÁS IDŐPONTJA: 1995. 07. 17.
- (vii) AZ ELŐZŐ BENYÚJTÁS ADATAI:
 (A) A BENYÚJTÁS SORSZÁMA: US 08/404,731
 (B) A BENYÚJTÁS IDŐPONTJA: 1995. 03. 15.
- (vii) AZ ELŐZŐ BENYÚJTÁS ADATAI:
 (A) A BENYÚJTÁS SORSZÁMA: US 08/344,227
 (B) A BENYÚJTÁS IDŐPONTJA: 1994. 11. 23. 1994
- 10 (viii) ÜGYVÉD/ÁGENS INFORMÁCIÓ:
 (A) NÉV:
 (B) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 62.645/PA/NG
- (ix) TÁVKÖZLÉSI INFORMÁCIÓK:
 (A) TELEFON: +361 34 24 950
 (B) TELEFAX: +361 34 24 323
- (2) 1. számú szekvencia:
 (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 13 aminosav
 (B) Típus: aminosav
 (C) Száلتípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris
 (ii) Molekulatípus: peptid
 (xi) A szekvencia leírása: 1. számú szekvenciavázlat
- Arg Arg Lys Arg Ser Gln Ser Ser Lys Glu Glu Lys Pro
 1 5
- (2) 2. számú szekvenciavázlat:
 (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 15 aminosav
 (B) Típus: aminosav
 (C) Száلتípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris
 (ii) Molekulatípus: peptid
 (xi) A szekvencia leírása: 2. számú szekvencia
- Arg Arg Lys Arg Ser Gln Ser Ser Lys Glu Glu Lys Pro
 1 5 10
 Leu Gln
 15
- (2) 3. számú szekvenciavázlat:
 (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 15 aminosav
 (B) Típus: aminosav
 (C) Száلتípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris
 (ii) Molekulatípus: peptid

(xi) A szekvencia leírása: 3. számú szekvencia

Arg Arg Lys Arg Ser Gln Ser Ser Lys Glu Glu Lys Pro
 1 5 10
 Phe Lys
 15

(2) 4. számú szekvenciavázlat:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 24 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: peptid

(xi) A szekvencia leírása: 4. számú szekvencia

Asp Leu Ile Glu Glu Ala Ala Val Ser Arg Ile Val Asp
 1 5 10
 Ala Val Ile Glu Glu Val Lys Ala Ala Gly Ala
 15 20

2) 5. számú szekvenciavázlat:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 9 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: peptid

(xi) A szekvencia leírása: 5. számú szekvencia

Gly Arg Arg Asn Ala Ile His Asp Ile
 1 5

2) 4. számú szekvenciavázlat:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 2257 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: cDNS

(ix) Tulajdonság:

(A) Név/Kulcs: CDS

(B) Lokalizáció: 1...1461

(xi) A szekvencia leírása: 6. számú szekvencia

CCG	CCC	CCG	CCC	CCG	CCC	CCA	CCG	CCC	CCT	CTC	GGG	GCC	GAC	CGC	GTC	48
Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Leu	Gly	Ala	Asp	Arg	Val	
1				5					10					15		
GTC	AAA	GCT	GTT	CCT	TTT	CCC	CCA	ACT	CAT	CGG	CTG	ACA	TCT	GAA	GAA	96
Val	Lys	Ala	Val	Pro	Phe	Pro	Pro	Thr	His	Arg	Leu	Thr	Ser	Glu	Glu	
			20					25					30			
GTG	TTT	GAT	ATG	GAT	GGG	ATA	CCC	AGG	GTT	GAT	GTT	CTG	AAG	AAC	CAC	144
Val	Phe	Asp	Met	Asp	Gly	Ile	Pro	Arg	Val	Asp	Val	Leu	Lys	Asn	His	
		35					40					45				
TTG	GTA	AAA	GAA	GGG	CGG	GTG	GAT	GAA	GAA	ATT	GCA	CTA	AGA	ATT	ATC	192
Leu	Val	Lys	Glu	Gly	Arg	Val	Asp	Glu	Glu	Ile	Ala	Leu	Arg	Ile	Ile	
	50					55					60					
AAT	GAG	GGT	GCT	GCC	ATA	CTT	CGG	CGG	GAG	AAA	ACC	ATG	ATA	GAA	GTA	240
Asn	Glu	Gly	Ala	Ala	Ile	Leu	Arg	Arg	Glu	Lys	Thr	Met	Ile	Glu	Val	
65					70					75					80	

HU 221 881 B1

GAA	GCT	CCA	ATT	ACA	GTG	TGT	GGT	GAC	ATC	CAT	GGC	CAA	TTT	TTT	GAT	288
Glu	Ala	Pro	Ile	Thr	Val	Cys	Gly	Asp	Ile	His	Gly	Gln	Phe	Phe	Asp	
				85					90						95	
CTG	ATG	AAA	CTT	TTT	GAA	GTA	GGA	GGA	TCA	CCT	GCT	AAT	ACA	CGA	TAC	336
Leu	Met	Lys	Leu	Phe	Glu	Val	Gly	Gly	Ser	Pro	Ala	Asn	Thr	Arg	Tyr	
			100					105							110	
CTT	TTT	CTT	GGT	GAT	TAT	GTG	GAC	AGA	GGT	TAT	TTT	AGT	ATA	GAG	TGT	384
Leu	Phe	Leu	Gly	Asp	Tyr	Val	Asp	Arg	Gly	Tyr	Phe	Ser	Ile	Glu	Cys	
		115					120					125				
GTC	TTA	TAT	TTA	TGG	GTC	TTG	AAG	ATT	CTA	TAC	CCA	AGC	ACA	TTA	TTC	432
Val	Leu	Tyr	Leu	Trp	Val	Leu	Lys	Ile	Leu	Tyr	Pro	Ser	Thr	Leu	Phe	
	130					135					140					
CTT	CTG	AGA	GGC	AAC	CAT	GAA	TGC	AGA	CAC	CTT	ACT	GAA	TAT	TTT	ACC	480
Leu	Leu	Arg	Gly	Asn	His	Glu	Cys	Arg	His	Leu	Thr	Glu	Tyr	Phe	Thr	
145				150						155					160	
TTT	AAG	CAG	GAA	TGT	AAA	ATT	AAA	TAT	TCA	GAA	AGA	GTC	TAT	GAA	GCT	528
Phe	Lys	Gln	Glu	Cys	Lys	Ile	Lys	Tyr	Ser	Glu	Arg	Val	Tyr	Glu	Ala	
				165					170					175		
TGT	ATG	GAG	GCT	TTT	GAC	AGC	TTG	CCC	CTT	GCT	GCA	CTT	CTA	AAC	CAA	576
Cys	Met	Glu	Ala	Phe	Asp	Ser	Leu	Pro	Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Asn	Gln	
			180					185						190		
CAA	TTT	CTT	TGT	GTT	CAT	GGT	GGA	CTT	TCA	CCA	GAA	ATA	CAC	ACA	CTG	624
Gln	Phe	Leu	Cys	Val	His	Gly	Gly	Leu	Ser	Pro	Glu	Ile	His	Thr	Leu	
		195					200					205				
GAT	GAT	ATT	AGG	AGA	TTA	GAT	AGA	TTT	AAA	GAG	CCA	CCT	GCA	TTT	GGA	672
Asp	Asp	Ile	Arg	Arg	Leu	Asp	Arg	Phe	Lys	Glu	Pro	Pro	Ala	Phe	Gly	
	210					215					220					
CCA	ATG	TGT	GAC	TTG	CTA	TGG	TCT	GAT	CCT	TCT	GAA	GAC	TTT	GGA	AAT	720
Pro	Met	Cys	Asp	Leu	Leu	Trp	Ser	Asp	Pro	Ser	Glu	Asp	Phe	Gly	Asn	
225				230						235					240	
GAA	AAA	TCA	CAA	GAA	CAT	TTT	AGT	CAT	AAT	ACA	GTT	CGA	GGA	TGT	TCT	768
Glu	Lys	Ser	Gln	Glu	His	Phe	Ser	His	Asn	Thr	Val	Arg	Gly	Cys	Ser	
				245					250					255		
TAT	TTT	TAT	AAC	TAT	CCA	GCA	GTG	TGT	GAA	TTT	TTG	CAA	AAC	AAT	AAT	816
Tyr	Phe	Tyr	Asn	Tyr	Pro	Ala	Val	Cys	Glu	Phe	Leu	Gln	Asn	Asn	Asn	
			260					265					270			
TTG	TTA	TCG	ATT	ATT	AGA	GCT	CAT	GAA	GCT	CAA	GAT	GCA	GGC	TAT	AGA	864
Leu	Leu	Ser	Ile	Ile	Arg	Ala	His	Glu	Ala	Gln	Asp	Ala	Gly	Tyr	Arg	
		275					280					285				
ATG	TAC	AGA	AAA	AGT	CAA	ACT	ACA	GGG	TTT	CCT	TCA	TTA	ATA	ACA	ATT	912
Met	Tyr	Arg	Lys	Ser	Gln	Thr	Thr	Gly	Phe	Pro	Ser	Leu	Ile	Thr	Ile	
	290					295					300					
TTT	TCG	GCA	CCT	AAT	TAC	TTA	GAT	GTC	TAC	AAT	AAT	AAA	GCT	GCT	GTA	960
Phe	Ser	Ala	Pro	Asn	Tyr	Leu	Asp	Val	Tyr	Asn	Asn	Lys	Ala	Ala	Val	
305				310						315					320	

HU 221 881 B1

CTA AAG TAT GAA AAT AAT GTG ATG AAC ATT CGA CAG TTT AAT TGC TCT	1008
Leu Lys Tyr Glu Asn Asn Val Met Asn Ile Arg Gln Phe Asn Cys Ser	
325 330 335	
CCA CAT CCT TAT TGG TTG CCC AAT TTT ATG GAT GTC TTT ACA TGG TCC	1056
Pro His Pro Tyr Trp Leu Pro Asn Phe Met Asp Val Phe Thr Trp Ser	
340 345 350	
TTA CCA TTT GTT GGA GAA AAA GTG ACA GAA ATG TTG GTA AAT GTT CTG	1104
Leu Pro Phe Val Gly Glu Lys Val Thr Glu Met Leu Val Asn Val Leu	
355 360 365	
AGT ATT TGT TCT GAT GAT GAA CTA ATG ACA GAA GGT GAA GAC CAG TTT	1152
Ser Ile Cys Ser Asp Asp Glu Leu Met Thr Glu Gly Glu Asp Gln Phe	
370 375 380	
GAT GTA GGT TCA GCT GCA GCC CGG AAA GAA ATC ATA AGA AAC AAG ATC	1200
Asp Val Gly Ser Ala Ala Ala Arg Lys Glu Ile Ile Arg Asn Lys Ile	
385 390 395 400	
CGA GCA ATT GGC AAG ATG GCA AGA GTC TTC TCT GTT CTC AGG GAG GAG	1248
Arg Ala Ile Gly Lys Met Ala Arg Val Phe Ser Val Leu Arg Glu Glu	
405 410 415	
AGT GAA AGC GTG CTG ACA CTC AAG GGC CTG ACT CCC ACA GGG ATG TTG	1296
Ser Glu Ser Val Leu Thr Leu Lys Gly Leu Thr Pro Thr Gly Met Leu	
420 425 430	
CCT AGT GGA GTG TTG GCT GGA GGA CGG CAG ACC TTG CAA AGT GGT AAT	1344
Pro Ser Gly Val Leu Ala Gly Gly Arg Gln Thr Leu Gln Ser Gly Asn	
435 440 445	
GAT GTT ATG CAA CTT GCT GTG CCT CAG ATG GAC TGG GGC ACA ACT CAC	1392
Asp Val Met Gln Leu Ala Val Pro Gln Met Asp Trp Gly Thr Thr His	
450 455 460	
TCT TTT GCT AAC AAT ACA CAT AAT GCA TGC AGG GAA CTC CTT CTG CTT	1440
Ser Phe Ala Asn Asn Thr His Asn Ala Cys Arg Glu Leu Leu Leu Leu	
465 470 475 480	
TTT AGT TCC TGT CTT AGC AGC TGACATATGC AGGGTATTAT GTGATAGGCA	1491
Phe Ser Ser Cys Leu Ser Ser	
485	
TCTGATTAGT ACCTGGCCAG GGCATAATAT TGATAGAACA AGTTGTCTTT TAACTGAAAA	1551
TAACAATCAG TTTCCAGAT TTTCATAAGG TGATATGGGG AGCAGCTCAT GTCATAATTC	1611
CGAAATATTT ATTCATTTGT TTAATGCACC CCTTTCCTTC AAAAGCCTCA GTCAAGAATG	1671
TGAATCAGGG ATATATCTAT ATATCTATTT ACACACATAC ATAAATATAT ATAACATAAA	1731
TGGAAATGTA ATTCCGAGTT TCTTACTTTT AAAATTTACG TAATTGTATT AGATTTTGCT	1791
TATGTTTTCA AGTATTTATT TTTGAGTTA AAATTTGCT TAGGCCCAA AACTTCCTTT	1851
ATGCACTCAT TTGCCAAAAG ATTTATGCTA AATTTGTAC CCTGGTAAAT GATTAGAGTT	1911
TGTTTTCTGT GGTGTTTGTC AAACGTTCTA TGTATAATTG ACTGTCTGTA ACATGCTGTT	1971
TCCTTCCTCT GCAGATATAG CTGCTTTCCT AAATCTGTCT GTCTTCTTT AGGATAGCTG	2031
TATGTCTGTA AATATATGTT CAATTAATTT ACTCTATCAG ACGCTTGTCT GTCTTTTGAT	2091
GTAGAAGCAA CTTTGTAGCA CCTTGATTTT AGGTTTGCTG CATTGTGTC TGCCTTGGT	2151
TCAGTCTGAA TATGAATGTA ACATTAGATA TTGAGCTATT GTTATAAAGG GTTGAATTTA	2211
AATCATGTAA GTCAAAATTG AAAGGGTGTT ATAAAGTGTG CCTTTA	2257

2) 7. számú szekvenciavázlat:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 487 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Száلتípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: fehérje

(xi) A szekvencia leírása: 7. számú szekvencia

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Gly Ala Asp Arg Val
 1 5 10 15
 Val Lys Ala Val Pro Phe Pro Pro Thr His Arg Leu Thr Ser Glu Glu
 20 25 30
 Val Phe Asp Met Asp Gly Ile Pro Arg Val Asp Val Leu Lys Asn His
 35 40 45
 Leu Val Lys Glu Gly Arg Val Asp Glu Glu Ile Ala Leu Arg Ile Ile
 50 55 60
 Asn Glu Gly Ala Ala Ile Leu Arg Arg Glu Lys Thr Met Ile Glu Val
 65 70 75 80
 Glu Ala Pro Ile Thr Val Cys Gly Asp Ile His Gly Gln Phe Phe Asp
 85 90 95
 Leu Met Lys Leu Phe Glu Val Gly Gly Ser Pro Ala Asn Thr Arg Tyr
 100 105 110
 Leu Phe Leu Gly Asp Tyr Val Asp Arg Gly Tyr Phe Ser Ile Glu Cys
 115 120 125
 Val Leu Tyr Leu Trp Val Leu Lys Ile Leu Tyr Pro Ser Thr Leu Phe
 130 135 140
 Leu Leu Arg Gly Asn His Glu Cys Arg His Leu Thr Glu Tyr Phe Thr
 145 150 155 160
 Phe Lys Gln Glu Cys Lys Ile Lys Tyr Ser Glu Arg Val Tyr Glu Ala
 165 170 175
 Cys Met Glu Ala Phe Asp Ser Leu Pro Leu Ala Ala Leu Leu Asn Gln
 180 185 190
 Gln Phe Leu Cys Val His Gly Gly Leu Ser Pro Glu Ile His Thr Leu
 195 200 205
 Asp Asp Ile Arg Arg Leu Asp Arg Phe Lys Glu Pro Pro Ala Phe Gly
 210 215 220
 Pro Met Cys Asp Leu Leu Trp Ser Asp Pro Ser Glu Asp Phe Gly Asn
 225 230 235 240
 Glu Lys Ser Gln Glu His Phe Ser His Asn Thr Val Arg Gly Cys Ser
 245 250 255
 Tyr Phe Tyr Asn Tyr Pro Ala Val Cys Glu Phe Leu Gln Asn Asn Asn
 260 265 270
 Leu Leu Ser Ile Ile Arg Ala His Glu Ala Gln Asp Ala Gly Tyr Arg
 275 280 285

Met Tyr Arg Lys Ser Gln Thr Thr Gly Phe Pro Ser Leu Ile Thr Ile
 290 295 300

Phe Ser Ala Pro Asn Tyr Leu Asp Val Tyr Asn Asn Lys Ala Ala Val
 305 310 315 320

Leu Lys Tyr Glu Asn Asn Val Met Asn Ile Arg Gln Phe Asn Cys Ser
 325 330 335

Pro His Pro Tyr Trp Leu Pro Asn Phe Met Asp Val Phe Thr Trp Ser
 340 345 350

Leu Pro Phe Val Gly Glu Lys Val Thr Glu Met Leu Val Asn Val Leu
 355 360 365

Ser Ile Cys Ser Asp Asp Glu Leu Met Thr Glu Gly Glu Asp Gln Phe
 370 375 380

Asp Val Gly Ser Ala Ala Ala Arg Lys Glu Ile Ile Arg Asn Lys Ile
 385 390 395 400

Arg Ala Ile Gly Lys Met Ala Arg Val Phe Ser Val Leu Arg Glu Glu
 405 410 415

Ser Glu Ser Val Leu Thr Leu Lys Gly Leu Thr Pro Thr Gly Met Leu
 420 425 430

Pro Ser Gly Val Leu Ala Gly Gly Arg Gln Thr Leu Gln Ser Gly Asn
 435 440 445

Asp Val Met Gln Leu Ala Val Pro Gln Met Asp Trp Gly Thr Thr His
 450 455 460

Ser Phe Ala Asn Asn Thr His Asn Ala Cys Arg Glu Leu Leu Leu Leu
 465 470 475 480

Phe Ser Ser Cys Leu Ser Ser
 485

2) 8. számú szekvenciavázlat:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 28 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: peptid

(xi) A szekvencia leírása: 8. számú szekvencia

Ser Ile Lys Arg Leu Val Thr Arg Arg Lys Arg Ser Glu Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Gln Gln Lys Pro Phe Lys Ala Lys Leu Gln Ser Glu
 20 25

2) 9. számú szekvenciavázlat:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 24 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: peptid

(xi) A szekvencia leírása: 9. számú szekvencia

Asp Leu Ile Glu Glu Ala Ala Ser Arg Ile Val Asp Ala Val Ile Glu
 1 5 10 15

Gln Val Lys Ala Ala Gly Ala Tyr
 20

2) 10. számú szekvenciavázlat:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 26 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 10. számú szekvencia

GTATTAGCAG GAGATCTTCC TACTTC

26

2) 11. számú szekvenciavázlat:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 25 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 11. számú szekvencia

GTGTGTGTAG ATCTGGTGAA AGTCC

25

2) 12. számú szekvenciavázlat:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 29 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 12. számú szekvencia

ATTGTAGAGA TCTAAGTAAT TAGGTGCCG

29

2) 13. számú szekvenciavázlat:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 28 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 13. számú szekvencia

GCCAATTGCT CAGATCTTGT TTCTTATG

28

2) 14. számú szekvenciavázlat:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 29 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 14. számú szekvencia

GGAATTCGGA TCCTCGAGAG ATCTCGCCG

29

2) 15. számú szekvenciavázlat:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 30 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

- (C) Száltípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris
 (xi) A szekvencia leírása: 15. számú szekvencia
 (ii) Molekulatípus: cDNS
 CCACTTTGAG ATCTCTACCG TCCTCCAGCC
 30
- 2) 16. számú szekvenciavázlat:
 (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 25 bázispár
 (B) Típus: nukleinsav
 (C) Száltípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris
 (ii) Molekulatípus: cDNS
 (xi) A szekvencia leírása: 16. számú szekvencia
 CCCTGAGATC TTCAGCTGCT AAGAC
 25
- 2) 17. számú szekvenciavázlat:
 (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 30 bázispár
 (B) Típus: nukleinsav
 (C) Száltípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris
 (ii) Molekulatípus: cDNS
 (xi) A szekvencia leírása: 17. számú szekvencia
 GGCTGAGATC TGGCAGACCT TGCAAAGTGG
 30
- 2) 18. számú szekvenciavázlat:
 (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 32 bázispár
 (B) Típus: nukleinsav
 (C) Száltípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris
 (ii) Molekulatípus: cDNS
 (xi) A szekvencia leírása: 19. számú szekvencia
 (ii) Molekulatípus: cDNS
 (xi) A szekvencia leírása: 18. számú szekvencia
 GTGATGAAGA TCTTACAGTT TAATTGCTCT CC
 32
- 2) 19. számú szekvenciavázlat:
 TTCTCCAGAT CTTGGTAAGG ACCATG
 26
- 2) 20. számú szekvenciavázlat:
 (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 30 bázispár
 (B) Típus: nukleinsav
 (C) Száltípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris
 (ii) Molekulatípus: cDNS
 (xi) A szekvencia leírása: 20. számú szekvencia
 CACCTTCTGT AGATCTTTCA TCATCAGAAC
 30
- 2) 21. számú szekvenciavázlat:
 (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 24 bázispár
 (B) Típus: nukleinsav

- (C) Száltípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris
 (ii) Molekulatípus: cDNS
 (xi) A szekvencia leírása: 21. számú szekvencia
 CATCGGCAGA TCTCTGAAGA AGTG
 24
- 2) 22. számú szekvenciavázlat:
 (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 29 bázispár
 (B) Típus: nukleinsav
 (C) Száltípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris
 (ii) Molekulatípus: cDNS
 (xi) A szekvencia leírása: 22. számú szekvencia
 CCATGGCCAA TTTTAGATCT CGATGAAAC
 29
- 2) 23. számú szekvenciavázlat:
 (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 30 bázispár
 (B) Típus: nukleinsav
 (C) Száltípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris
 (ii) Molekulatípus: cDNS
 (xi) A szekvencia leírása: 23. számú szekvencia
 GGACCATGAG ATCTAATCCA TAAAATTGGG
 30
- 2) 24. számú szekvenciavázlat:
 (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 31 bázispár
 (B) Típus: nukleinsav
 (C) Száltípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris
 (ii) Molekulatípus: cDNS
 (xi) A szekvencia leírása: 24. számú szekvencia
 AAATGGGAGA TCTAATAAGG ATGTGGAGAG C
 31
- 2) 25. számú szekvenciavázlat:
 (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 32 bázispár
 (B) Típus: nukleinsav
 (C) Száltípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris
 (ii) Molekulatípus: cDNS
 (xi) A szekvencia leírása: 32. számú szekvencia
 GGAGAGCAAT TAAAGATCTA AATGTTTCATC AC
 32
- 2) 26. számú szekvenciavázlat:
 (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 27 bázispár
 (B) Típus: nukleinsav
 (C) Száltípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris
 (ii) Molekulatípus: cDNS
 (xi) A szekvencia leírása: 27. számú szekvencia
 TTTTCATAGA TCTATACAAG CAGCTTT
 27
- 2) 27. számú szekvenciavázlat:
 (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 36 bázispár
 (B) Típus: nukleinsav

- (C) Száltípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris
 (ii) Molekulatípus: cDNS
 (xi) A szekvencia leírása: 27. számú szekvencia
 CAACCAGATC TAATGTGGAG AGCAATTAAA CTGTCC
 36
- 2) 28. számú szekvenciavázlat:
 (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 33 bázispár
 (B) Típus: nukleinsav
 (C) Száltípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris
 (ii) Molekulatípus: cDNS
 (xi) A szekvencia leírása: 33. számú szekvencia
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:28:
 CCAATAAGAG ATCTAAGAGC AATTAACTG TCG
 33
- 2) 29. számú szekvenciavázlat:
 (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 35 bázispár
 (B) Típus: nukleinsav
 (C) Száltípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris
 (ii) Molekulatípus: cDNS
 (xi) A szekvencia leírása: 29. számú szekvencia
 TGTGAGATCT AATTAACTG TCGAATGTTC ATCAC
 38
- 2) 30. számú szekvenciavázlat:
 (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 32 bázispár
 (B) Típus: nukleinsav
 (C) Száltípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris
 (ii) Molekulatípus: cDNS
 (xi) A szekvencia leírása: 32. számú szekvencia
 GGAGAGCAGA TCTACTGTCG AATGTTTCATC AC
 32
- 2) 31. számú szekvenciavázlat:
 (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 40 bázispár
 (B) Típus: nukleinsav
 (C) Száltípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris
 (ii) Molekulatípus: cDNS
 (xi) A szekvencia leírása: 31. számú szekvencia
 AAGGATAGAT CTAGCAATTA AACTGTCGAA TGTTTCATCAC
 40
- 2) 32. számú szekvenciavázlat:
 (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 54 bázispár
 (B) Típus: nukleinsav
 (C) Száltípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris
 (ii) Molekulatípus: cDNS
 (xi) A szekvencia leírása: 32. számú szekvencia
 TACAAC TAGT ACCATGGTCG ATGGTCGACA GATCTCTCGA GAAGCTTAGC TAGC
 54
- 2) 33. számú szekvenciavázlat:
 (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 981 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 33. számú szekvencia

CAGAGTATCG ATGAAATCTA CAAATATGAC AAAAAACAAC AACAGAAAT CCTGGCGGCG
60

AAACCCTGGA CTAAGGATCA CCACTACTTT AAATACTGCA AAATCTCAGC ATTGGCTCTA
120

CTGAAAATGG TGATGCATGC CAGGTCAGGA GGCAACTTGG AAGTGATGGG TTTGATGCTC
180

GGGAAAGTCG ACGGCGAGAC CATGATCATC ATGGACAGTT TCGCTTTGAC TGTAGAGGGC
240

ACAGAAACTC GAGTAAATGC TCAAGCTGCT GCGTATGAGT ATATGGCTGC ATACATAGAA
300

AATGCCAAAC AGGTTGGCCG CCTTGAGAAT GCAATCGGTT GGTATCATAG CCACCCTGGT
360

TATGGCTGCT GGCTCTCCGG GATTGATGTT AGTACACAGA TGCTGAACCA GCAGTTTCAA
420

GAACCATTTG TAGCAGTGGT GATTGATCCA ACCAGAACAA TCTCTGCAGG AAAAGTGAAT
480

CTTGCGCCT TTAGGACATA TCCAAAGGGC TACAAACCTC CTGATGAAGG ACCTTCTGAG
540

TACCAGACTA TCCCACCTTA ATAAAATAGA AGATTTGGGC GTGCACTGAA ACAATATTAT
600

GCCTTAGAAG TCTCATATTT CAAATCATCT TGGATCGTAA ACTACTTGAG CTTTGGTGGG
660

ATAAATACTG GGTGAATACC CTGAGTCCTC TAGCTTGCTT ACTAATGCAG ACTACACCAC
720

AGGCCAGGTG TTGATTTGTC TGAGAAGTTA GAGCAGTCGG AAGCCCAACT GGGACGTGGC
780

AGTTTCATGT TGGGCTTAGA AACACATGAC CGCAAGTCGG AAGACAAACT TGCCAAAGCT
840

ACTAGAGACA GCTGTAAAAC CACCATAGAA GCCACCATGG ACTGATGTCT CAGGTTATTA
900

AGGATAAACT GTTTAATCAG ATTAACGTTG TTAGTTACCA CCACGTACTT CTCAAAGTGG
960

TGTGTGGAAG GAAAAGAGCT C
981

2) 34. számú szekvenciavázlat:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 919 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 34. számú szekvencia

AAACCCTGGA CTAAGGATCA CCACTACTTT AAATACTGCA AAATCTCAGC ATTGGCTCTA
60

CTGAAAATGG TGATGCATGC CAGGTCAGGA GGCAACTTGG AAGTGATGGG TTTGATGCTC
120

GGGAAAGTCG ACGGGGAGAC CATGATCATC ATGGACAGTT TCGCTTTGCT GTAGAGGGCA
180

CAGAAACTCG AGTAAATGCT CAAGCTGCTG CGTATGAGTA TATGGCTGCA TACATAGAAA
240

ATGCCAAACA GGTGGCCGC CTTGAGAATG CAATCGGTTG GTATCATAGC CACCCTGGTT
300

ATGGCTGCTG GCTCTCCGGG ATTGATGTTA GTACACAGAT GCTGAACCAG CAGTTTCAAG
360

AACCATTTGT AGCAGTGGTG ATTGATCCAA CCAGAACAAT CTCTGCAGGA AAAGTGAATC
420

TTGGCGCCTT TAGGACATAT CCAAAGGGCT ACAAACCTCC GATGAAGGAC CTTCTGAGTA
480

CCAGACTATC CCACCTTAAT AAAATAGAAG ATTTGGGCGT GCACTGAAAC AATATTATGC
540

CTTAGAAGTC TCATATTCA AATCATCTTG GATCGTAAAC TACTTGAGCT TTGGTGAAT
600

AAATACTGGG TGAATACCCT GAGTCCTCTA GCTTGCTTAC TAATGCAGAC TACACCACAG
660

GCCAGGTGTT GATTTGTCTG AGAAGTTAGA GCAGTCGGAA GCCCAACTGG GACGTGGCAG
720

TTTCATGTTG GGCTTAGAAA CACATGACCG CAAGTCGGAA GACAAACTTG CCAAAGCTAC
780

TAGAGACAGC TGTAACCA CCATAGAAGC CACCATGGAC TGATGTCTCA GGTTATTAAG
840

GATAAACTGT TTAATCAGAT TAACGTTGTT AGTTACCACC ACGTACTTCT CAAAGTGGTG
900

TGTGGAAGGA AAAGAGCTC
919

2) 35. számú szekvenciavázlat:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 541 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 35. számú szekvencia

GACCACCGAG ATGCCAATTC CAGTGTTCATG AGATTTCTGC GAGACCTCAT CCACACAGGA
60

GTAGCCAATG ATTTATCTGT TTTCTTACAG CATGAAGAAG ATTTTGTTC GGAAGGAACT
120

AATTGGACAG GTGATGAGCC AGCTTGGGCA GCAACTTGTC AGCCAGCTGC TCCACACATG
180

CTGCTTTTGG TTCCCCCTA CACCCTACCC GACGTGGTTG AAGTGCTCTG GGAGATCATG
240

CAGGTTGACA GACCGACTTT CTGTCGGTGG CTAGAGAATT CCTTGAAAGG TTTGCCAAAA
300

GAGACCACAG TGGGAGCTGT CACAGTGACA CATAACAAC TTACAGATT CCACAAGCAA
360

GTCACTAGTG CCGAGGAATG TAAGCAAGTT TGCTGGGCCT TGAGAGACTT CACCAGGTTG
420

TTTCGATAGC TCAAGCTCAC ACTCCTGCAC TGTGCCTGTC ATCCAGGAAT GTCTTTTTTT
480

ATTAGAAGAC AGGAAGAAAA CAACCCAGAC TGTGTCCAC AATCAGAAAC CTCTGTTGTG
540

G

541

(2) 36. számú szekvenciavázlat:

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 519 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: cDNS

(xi) A szekvencia leírása: 36. számú szekvencia

CGAGATGCCA ATTCCAGTGT CATGAGATT CTGCGAGACC TCATCCACAC AGGAGTAGCC
60

AATGATCATG AAGAAGATTT TGAATTGCGG AAGGAACTAA TTGGACAGGT GATGAGCCAG
120

CTTGGCCAGC AACTTGTCAG CCAGCTGCTC CACACATGCT GCTTTTGTCT TCCCCCTACA
180

CCCTACCCGA CGTGGTTGAA GTGCTCTGGG AGATCATGCA GGTTGACAGA CCGACTTTCT
240

GTCGGTGGCT AGAGAATTCC TTGAAAGGTT TGCCAAAAGA GACCACAGTG GGAGCTGTCA
300

CAGTGACACA TAAACAACCT ACAGATTTCC ACAAGCAAGT CACTAGTGCC GAGGAATGTA
360

AGCAAGTTTG CTGGGCCTTG AGAGACTTCA CCAGGTTGTT TCGATAGCTC AAGCTCACAC
420

TCCTGCACTG TGCCTGTCAT CCAGGAATGT CTTTTTTTAT TAGAAGACAG GAAGAAAACA
480

ACCCAGACTG TGTCCACAA TCAGAAACCT CTGTTGTGG
519

2) 37. számú szekvenciavázlat:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 14 aminosav
 (B) Típus: aminosav
 (C) Száلتípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: peptid

(xi) A szekvencia leírása: 37. számú szekvencia

Phe Xaa Arg Arg Lys Lys Ala Ala Lys Ala Leu Ala Pro Lys
 1 5 10

2) 38. számú szekvenciavázlat:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 14 aminosav
 (B) Típus: aminosav
 (C) Száلتípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: peptid

(xi) A szekvencia leírása: 38. számú szekvencia

Phe Ala Ala Arg Lys Lys Ala Ala Lys Ala Leu Ala Pro Lys
 1 5 10

2) 39. számú szekvenciavázlat:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 14 aminosav
 (B) Típus: aminosav
 (C) Száلتípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: peptid

(xi) A szekvencia leírása: 39. számú szekvencia

Phe Lys Arg Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Leu Ala Pro Lys
 1 5 10

2) 40. számú szekvenciavázlat:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 14 aminosav
 (B) Típus: aminosav
 (C) Száلتípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: peptid

(xi) A szekvencia leírása: 40. számú szekvencia

Phe Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Leu Ala Pro Lys
 1 5 10

2) 41. számú szekvenciavázlat:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 14 aminosav
 (B) Típus: aminosav
 (C) Száلتípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: peptid

(xi) A szekvencia leírása: 41. számú szekvencia

Phe Lys Arg Arg Lys Lys Ala Ala Ala Ala Leu Ala Pro Ala
 1 5 10

2) 42. számú szekvenciavázlat:

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 14 aminosav
 (B) Típus: aminosav
 (C) Száلتípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: peptid

(xi) A szekvencia leírása: 42. számú szekvencia

Phe Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ala Pro Ala
 1 5 10

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Tisztított és izolált polinukleotid, amely egy polipeptidligandumot kódol, és ez utóbbi megköti a 33. szekvenciájú pACT 59, a 34. szekvenciájú pACT 74, a 35. szekvenciájú pACT36 vagy a 36. szekvenciájú pACT60 csoportba tartozó A-kináz rögzítőfehérje 79-et (AKAP 79).

2. Polipeptidligandum, amely megköti az 1. igénypont szerinti 33. szekvenciájú pACT 59, a 34. szekvenciájú pACT 74, a 35. szekvenciájú pACT36 vagy a 36. szekvenciájú pACT60 csoportba tartozó A-kináz rögzítőfehérje 79-et (AKAP 79).

3. Eljárás egy feltételezett inhibitor vegyület azonosítására, amely gátolja egy rögzítőfehérje és egy kötőpartner közötti kötés kialakulását, és ez a kötőpartner a PKA I. típusú szabályozó alegysége vagy egy kalcineurin polipeptid, *azzal jellemezve*, hogy

a rögzítőfehérjét és a kötőpartnert a feltételezett inhibitor vegyület jelenlétében és távollétében inkubáljuk, olyan körülmények között, amelyek megfelelnek a rögzítőfehérje és a kötőpartner közötti kötődés kialakulásának, ahol is a rögzítőfehérjét egy szilárd hordozóhoz rögzítjük, és a kötőpartnert jelöléssel látjuk el;

a megkötetlen kötőpartnert lemoszuk a szilárd hordozóról;

meghatározzuk az immobilizált rögzítőfehérjéhez kötött kötőpartner mennyiségét;

összehasonlítjuk a rögzítőfehérjéhez a vegyület jelenlétében kötött kötőpartner mennyiségét a rögzítőfehérjéhez a vegyület távollétében kötött kötőpartner mennyiségével; és

ebből meghatározzuk, hogy a vegyület gátolja-e a rögzítőfehérje és a kötőpartner közötti kötődés kialakulását.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kötőpartnert radioaktív jelöléssel látjuk el.

5. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kötőpartnert egy fluorofórral jelöljük.

6. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy rögzítőfehérjeként az AKAP (A-kináz rögzítőfehérje) 79-et alkalmazzuk.

7. A 3. igénypont szerinti eljárás, amely szerint a kalcineurin polipeptid egy deléciós mutáns, amelyet a 7. számú szekvencia alábbi aminosavaiból álló kalcineurin polipeptidek közül választunk ki: 1-487, 1-400, 1-312, 1-204, 1-104, 332-487, 441-487, 332-441, 1-375, 1-354, 30-375, 98-375, 1-347, 1-340, 1-330, 1-320, 1-338, 1-336, 1-334, 1-332 és 1-335.

8. Kalcineurin deléciós mutáns, amelyet 7. számú szekvencia alábbi aminosavaiból álló kalcineurin polipeptidek közül választunk ki: 1-487, 1-400, 1-312, 1-204, 1-104, 332-487, 441-487, 332-441, 1-375, 1-354, 30-375, 98-375, 1-347, 1-340, 1-330, 1-320, 1-338, 1-336, 1-334, 1-332 és 1-335.

9. A

Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile-His-Asp-Ile
vagy az

Asp-Leu-Ile-Glu-Glu-Ala-Ala-Ser-Arg-Ile-Val-Asp-Ala-Val-Ile-Glu-Gln-Val-Lys-Ala-Ala-Gly-Ala

aminosavszekvencia alkalmazása olyan gyógyszer előállítására, amely fokozza az interleukin-2 kifejeződését egy T-limfocitában, *azzal jellemezve*, hogy a T-limfocitát valamelyik előbbi aminosavszekvenciával hozzuk érintkezésbe.

10. A 9. igénypont szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve*, hogy az aminosavszekvenciák mirisztilezve vannak.

11. A 9. igénypont szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve*, hogy a T-sejtet forbol-12-mirisztát-13-acetáttal és ionomicinnel aktiváljuk.

12. Eljárás kalcineurin izolálására egy azt tartalmazó sejtfraekcióból, *azzal jellemezve*, hogy a sejtfraekciót érintkezésbe hozzuk egy szilárd hordozóhoz rögzített AKAP 79-cel vagy annak egy kalcineurinkötő fragmentumával, majd eluáljuk a kalcineurint.

13. Egy kalcineurint kötő peptid, amely adott esetben megköti a PKA-t és az

Arg-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Ser-Ser-Lys-Glu-Glu-Lys-Pro,

Arg-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Ser-Ser-Lys-Glu-Glu-Lys-Pro-Leu-Gln

vagy az

Arg-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Ser-Ser-Lys-Glu-Glu-Lys-Pro-Phe-Lys

aminosavszekvenciát tartalmazza, alkalmazása olyan gyógyszer előállítására, amely a kalcineurinaktivitást gátolja egy sejtben, *azzal jellemezve*, hogy a sejtet érintkezésbe hozzuk a kalcineurint kötő peptiddel.

14. In vitro eljárás annak meghatározására, hogy egy sejt tartalmaz-e kalcineurint kötő partnert és PKA-t kötő rögzítőfehérjét, *azzal jellemezve*, hogy

i) a sejtet lizátum előállításához lizáltatjuk;

ii) a lizátumot egy szilárd hordozóval inkubáljuk, amely szilárd hordozó rögzített kalcineurinmolekulákat tartalmaz;

iii) a lizátumot lemoszuk a szilárd hordozóról;

iv) a szilárd hordozót érintkezésbe hozzuk egy jelzett PKA szabályozó alegységgel, amely megköti a rögzítőfehérjét;

v) a szabályozó alegységet lemoszuk a szilárd hordozóról;

vi) kimutatjuk a szilárd hordozón maradt jelölést és

vii) ebből meghatározzuk egy kalcineurint kötő partner és PKA-t kötő rögzítőfehérje jelenlétét a sejtben.

15. In vitro eljárás az interleukinexpresszió fokozására egy T-limfocitában, *azzal jellemezve*, hogy a T-limfocitát a

Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile-His-Asp-Ile

vagy az

Asp-Leu-Ile-Glu-Glu-Ala-Ala-Ser-Arg-Ile-Val-Asp-Ala-Val-Ile-Glu-Gln-Val-Lys-Ala-Ala-Gly-Ala

aminosavszekvenciával hozzuk érintkezésbe.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az aminosavszekvenciák mirisztilezve vannak.

17. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a T-sejteket forbol-12-mirisztát-13-acetáttal és ionomicinnel aktiváljuk.

18. In vitro eljárás a kalcineurinaktivitás gátlására egy sejtben, *azzal jellemezve*, hogy a sejtet egy kalcineurint kötő peptiddel, amely adott esetben megköti a PKA-t és az

Arg-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Ser-Ser-Lys-Glu-Glu-Lys-Pro,

Arg-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Ser-Ser-Lys-Glu-Glu-Lys-Pro-Leu-Gln

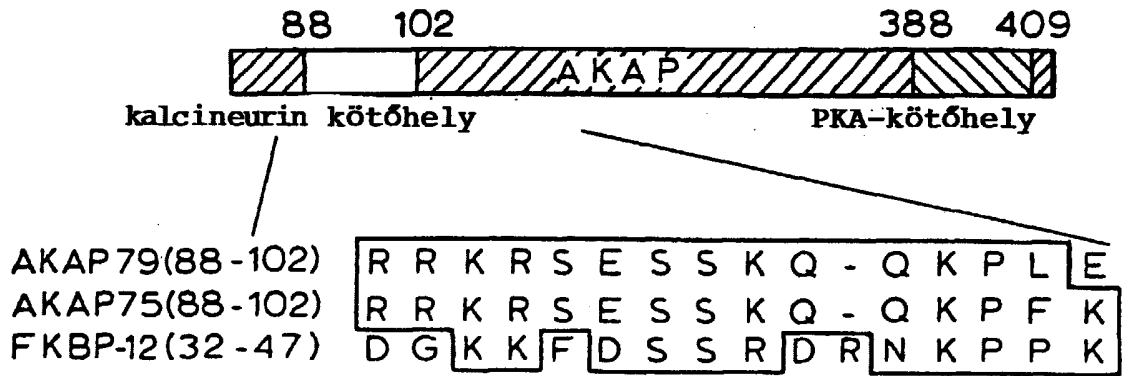
vagy az

Arg-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Ser-Ser-Lys-Glu-Glu-Lys-Pro-Phe-Lys

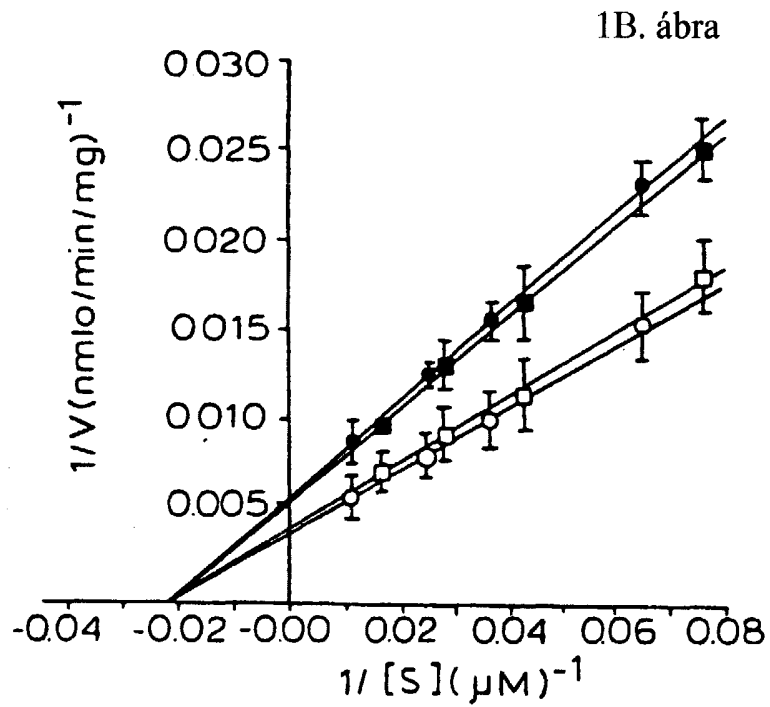
aminosavszekvenciát tartalmazza, hozzuk érintkezésbe.

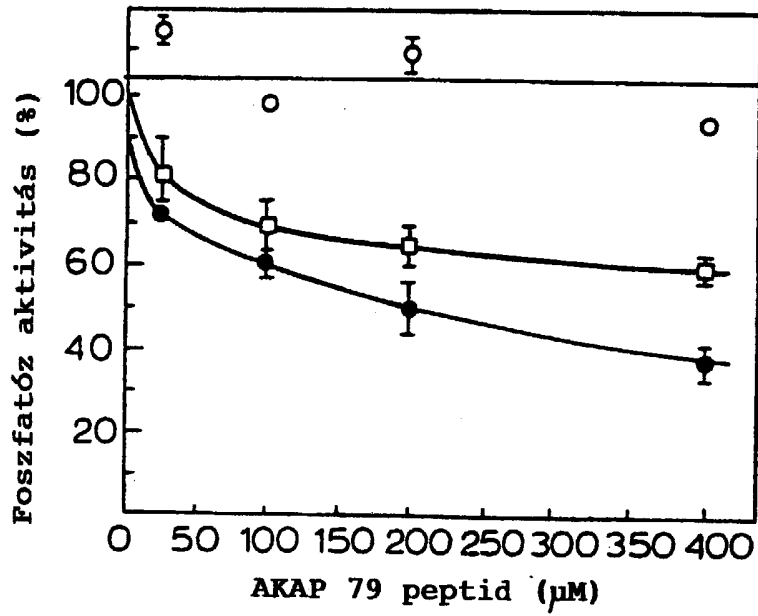
19. A 13. igénypont szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve*, hogy az aminosavszekvenciák mirisztilezve vannak.

20. A 18. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az aminosavszekvenciák mirisztilezve vannak.

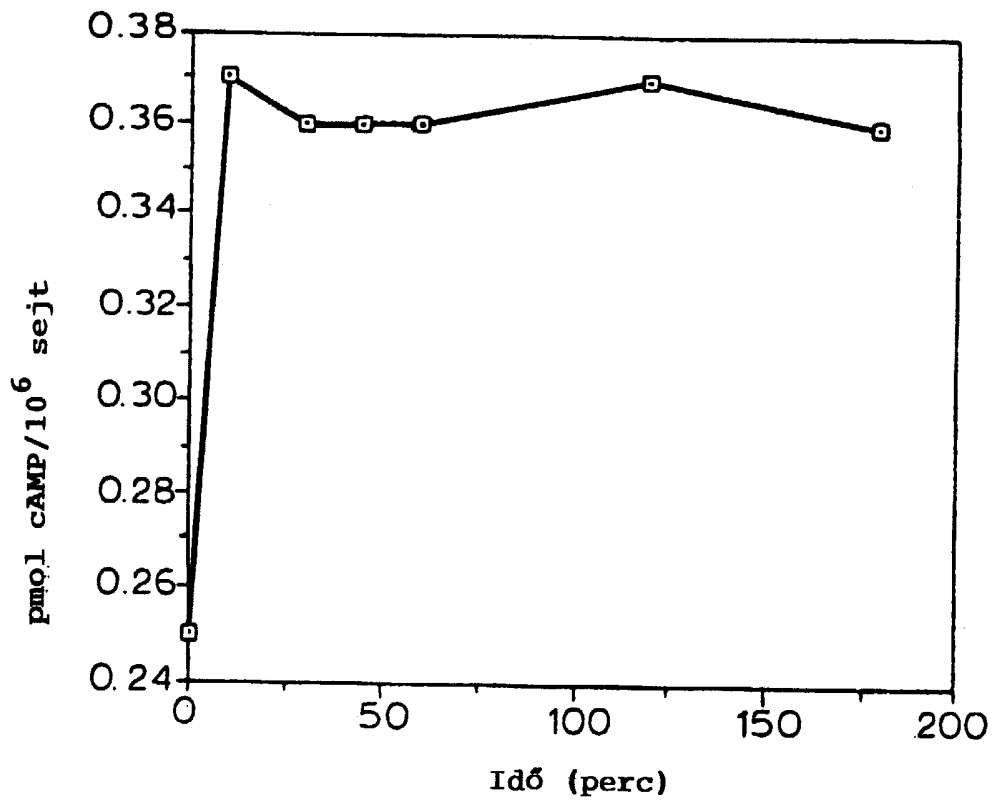


1A. ábra





1C. ábra

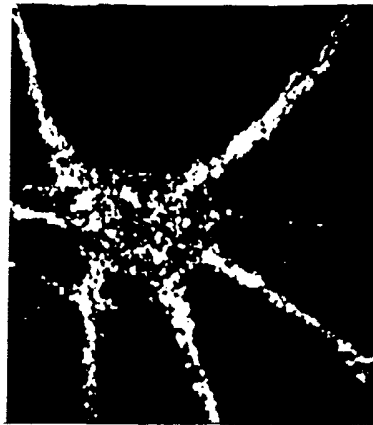


4. ábra

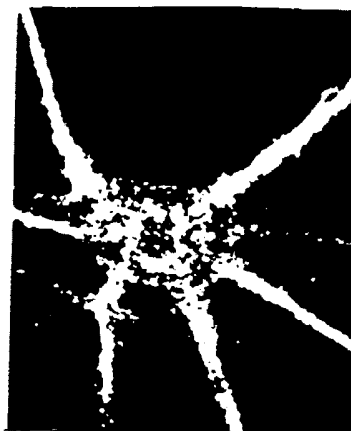
2A. ábra



2B. ábra



2C. ábra

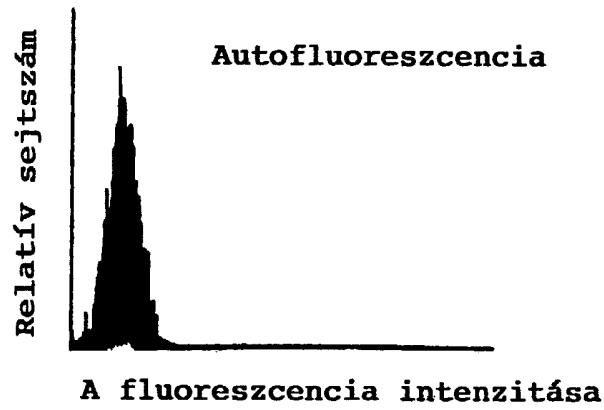


Mu klón 11.1 Hu kalcineurin A1	----- MAAPEPARAA PPPPPPPPPP GADRVVKAV PFPPTHRLTS EEVFDGIP GADRVVKAV PFPPTHRLTS EEVFDGIP	40 50
Mu klón 11.1 Hu kalcineurin A1	RVDVVKHVL KEGRVDEEIA LRIINEGAAL LRREKTHIEV EAPITVCGDI RVDVVKHVL KEGRVDEEIA LRIINEGAAL LRREKTHIEV EAPITVCGDI	90 100
Mu klón 11.1 Hu kalcineurin A1	HGQFFDLMKL FEVGSPANT RYFLGDYVD RGYFSIEHVL HGQFFDLMKL FEVGSPANT RYFLGDYVD RGYFSIEHVL ----- GTEDISINPH	130 150
Mu klón 11.1 Hu kalcineurin A1	----- NNINECVIYL WVKILYPT LFLLRGNHEC RHLTEYFTFK QECKIKYSER WVKILYPT LFLLRGNHEC RHLTEYFTFK QECKIKYSER	172 200
Mu klón 11.1 Hu kalcineurin A1	VYEACHEAFD SLPLAALLNQ QFLCVRHGGLS PEIHTLDDIR RLDRFKEPPA VYEACHEAFD SLPLAALLNQ QFLCVRHGGLS PEIHTLDDIR RLDRFKEPPA	222 250
Mu klón 11.1 Hu kalcineurin A1	FGPMCDLLWS DPSEDFGNEK SOEHFSKNTV RGC SYFYNY P AVCEFLQNNN FGPMCDLLWS DPSEDFGNEK SOEHFSKNTV RGC SYFYNY P AVCEFLQNNN	272 300

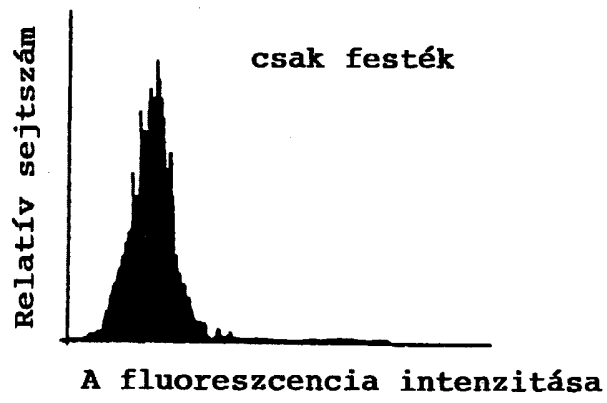
3. ábra

Mu klón 11.1 Hu kalcineurin A1	LLSIIRAHEA QDAGYRMYRK SQTTFPSLI TIFSAPNYLD VYNNKAAVLK LLSIIRAHEA QDAGYRMYRK SQTTFPSLI TIFSAPNYLD VYNNKAAVLK	322 350
Mu klón 11.1 Hu kalcineurin A1	YENNVNIRQ FNCSPHPYL PNFMDVFTWS LPFVGEKYTE MLVNVLSICS YENNVNIRQ FNCSPHPYL PNFMDVFTWS LPFVGEKYTE MLVNVLSICS	372 400
Mu klón 11.1 Hu Calcineurin A1	DDELMTEGED QFDGSAAR KEIIRNKIRA IGKMARVFSV LREESESVLT DDELMTEGED QFDGSAAR KEIIRNKIRA IGKMARVFSV LREESESVLT	422 449
Mu klón 11.1 Hu kalcineurin A1	LKGLTPTGML PSGVLGGRO TQSGNDVMO LAVPQMDWGT LKGLTPTGML PSGVLGGRO TQSGNDVMO LAVPQMDWGT	472 499
Mu klón 11.1 Hu kalcineurin A1	ACREFLLIFS SCLSS ACREFLLIFS SCLSS	487 514

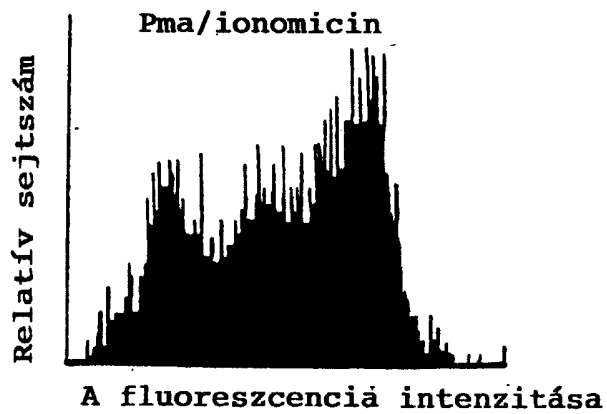
3. ábra (folytatás)



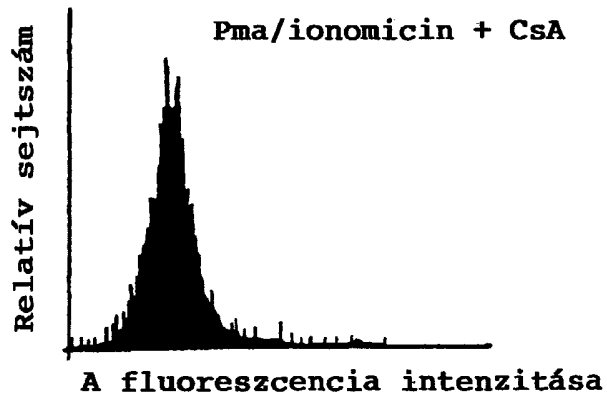
5A. ábra



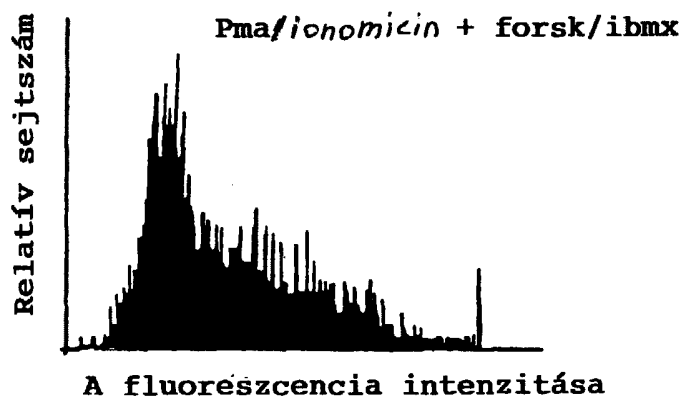
5B. ábra



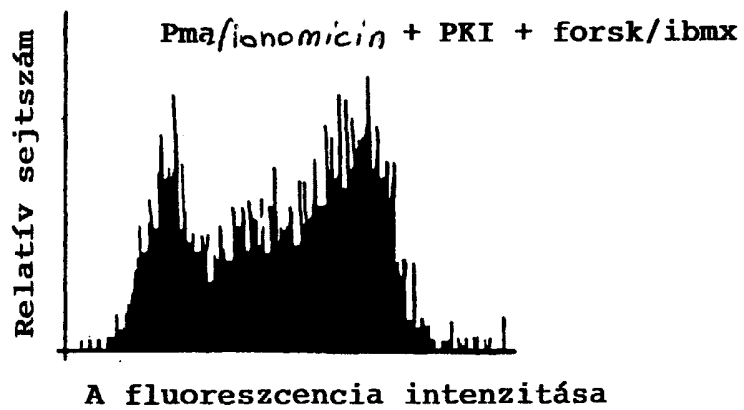
5C. ábra



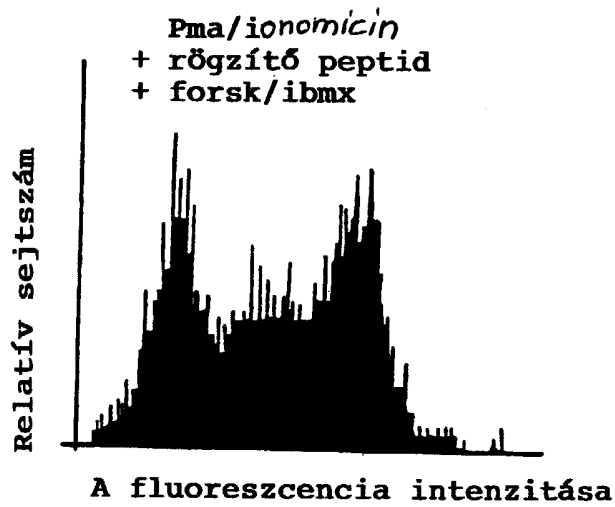
5D. ábra



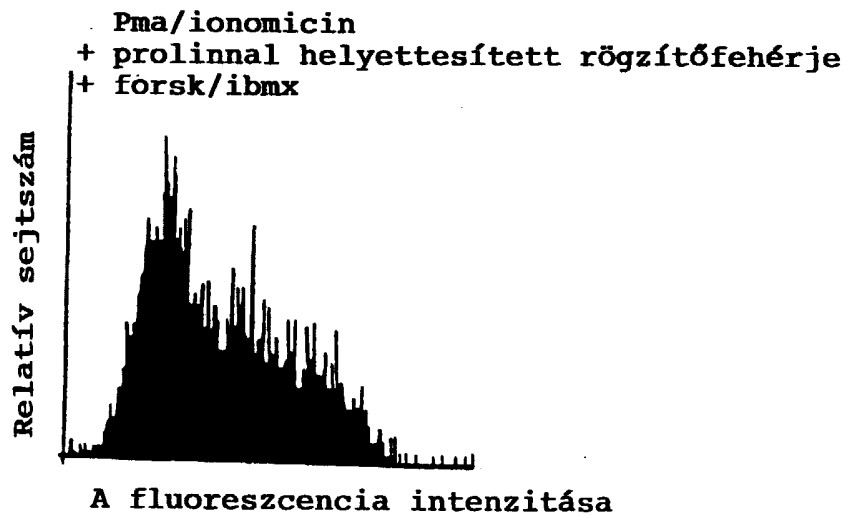
5E. ábra



5F. ábra



5G. ábra



5H. ábra