

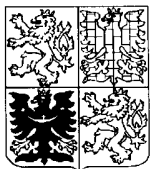
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2000 -3935

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **30.04.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **01.05.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/071699**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.12.2001**
(Věstník č. 12/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/US99/09502**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/57271**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/12
C 12 N 1/21
C 12 N 5/10
C 07 K 14/705
A 61 K 39/21
A 61 K 39/12
A 61 K 38/17
A 61 K 39/39

(71) Přihlašovatel:
**THE TEXAS A & M UNIVERSITY SYSTEM, College
Station, TX, US;**

(72) Původce:
Collisson Ellen W., Bryan, TX, US;
Hash Stephen M., Carlboro, NC, US;
Choi InSou, College Station, TX, US;

(74) Zástupce:
Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Kočičí CD80, kočičí CD86, kočičí CD28 a kočičí
CTLA-4 nukleové kyseliny a polypeptidy**

(57) Anotace:

Řešení poskytuje izolovanou a purifikovanou DNA kódující kočičí CD80 (B7-1) ligand, kočičí CD86 (B7-2) ligand, kočičí CD28 receptor nebo kočičí CTLA-4 (CD152) receptor a stejně tak vektory obsahující nukleovou kyselinu kódující kočičí CD80 (B7-1) ligand, kočičí CD86 (B7-2) ligand, kočičí CD28 receptor nebo kočičí CTLA-4 (CD152) receptor. Dále poskytuje hostitelské buňky transformované CD80-kódujícími vektory, CD86-kódujícími vektory, CD28-kódujícími vektory, CTLA-4-kódujícími vektory. Řešení poskytuje polypeptidy kódované nukleovou kyselinou kočičí CD80, kočičí CD86, kočičí CD28, kočičí CTLA-4. Dále poskytuje vakcínu obsahující účinné množství polypeptidů kódovaných nukleovou kyselinou kočičí CD80, kočičí CD86, kočičí CD28, kočičí CTLA-4 a vakcíny, která dále obsahuje imunogeny odvozené z patogenů a vakcíny, které jsou schopny posilovat imunitní odezvu a vakcíny, které jsou schopné potlačovat imunitní odezvu.

Kočičí CD80, kočičí CD86, kočičí CD28 a kočičí CTLA-4
nukleové kyseliny a polypeptidy

Oblast techniky

Vynález se týká kočičích CD80, kočičí CD86, kočičí CD28 a kočičí CTLA-4 nukleových kyselin a polypeptidů.

Dosavadní stav techniky

V současné době neexistují žádné úspěšné vakcíny pro prevenci proti kočičí imunodeficienci a kočičí infekční peritonitidě u koček. Vakcíny proti viru kočičí leukémie jsou sice dostupné, ale míra jejich účinnosti není přesvědčivá a je pravda, že v některých případech mohou vyvolat onemocnění. Existuje tedy potřeba nalézt činidla a kompozice, které by poskytovaly ochranu před těmito a dalšími chorobami v případech, kde vakcína neexistuje, nebo které by zlepšovaly účinnost již existujících a běžně používaných vakcín. Rovněž je třeba zmínit obtížnost vakcinace koťat v důsledku jejich neschopnosti překonat mateřské protilátky. Bezpečná a účinná činidla, která by pomohla tyto bariéry překonat, jsou tedy velmi potřebná.

Předpokládá se, že stimulace T-buněčné aktivace a proliferace v odezvě na chorobu hostitele závisí na dvou interakcích: rozpoznání T-buněčného receptoru (TCR) imunogenními peptidy v asociaci s molekulami MHC I. tř. a sekundární interakci přídatných ligandů, například CD80 a CD86, s jejich koreceptory CD28 a/nebo CTLA-4 na T-buňce. Úspěšná interakce těchto dvou drah vede k aktivaci a

proliferaci jak $CD4^+$, tak $CD8^+$ T-buněk a ke zvýšené produkci cytokinů regulujících imunitu typu Th1 a Th2. Za absence odpovídající kostimulace T-buněk se může vyvinout anergický stav, při kterém nedochází k proliferaci T-buněk a sekreci cytokinů. V průběhu let byly jako klíčové regulátory T-buněčných odezev CD28 a jeho ligandů, identifikovány dvě molekuly, tj. CD80 a CD86. CD28 je primární T-buněčný kostimulační receptor, který po interakci s CD80 a CD86 zvyšuje T-buněčnou proliferaci a syntézu cytokinů, čímž zabraňuje T-buněčné smrti. CTLA-4 (rovněž označovaný jako CD152), tj. homolog CD28, hraje rovněž důležitou roli při kostimulaci. Přestože jeho úloha není zcela prostudována, zdá se, že inhibuje T-buněčné kostimulační odezvy. Interakce a souhra mezi CD28, CTLA-4 a jejich ligandy CD80 a CD86 při kostimulačních procesech představují klíč k celkové indukci a supresi imunitních odezev na choroby hostitele. To umožňuje manipulaci exprese těchto 4 kostimulačních molekul regulovat T-buněčné odezvy přes zesílení, potlačení nebo přesměrování, a vytvořit tak požadovanou imunitní odezvu směřující k určitému kočičímu patogenu nebo kočičímu chorobnému stavu. Tyto kostimulační molekuly jsou použitelné zejména při vakcinaci proti infekčním chorobám, léčení infekčních chorob a léčení novotvarů, degenerativních, autoimunitních a imuno-deficitních stavů.

T-lymfocyty imunitního systému savců mají jak regulační funkci, tak funkci efektorů. T-buněčné progenitory vznikají v kostní dřeni z kmenové buňky a migrují do thymusu. V thymusu probíhá zrání a selekce a tvoří se panenské populace imunitních buněk, které jsou schopny rozpoznat antigen v asociaci s prezentací hlavního histokompatibilního komplexu (MHC), ale nejsou autoreakční.

Po dozrání v thymusu je každá T-buňka opatřena klonálně distribuovaným T-buněčným receptorem (TCR), který určuje její antigenní specifitu. $CD4^+$ a $CD8^+$ T-buňky (tj. dva hlavní podsoubory, které se nacházejí v těle většiny dospělých savců), mají TCR tvořený α a β podjednotkou (Allison a Lanier, 1987).

Proteinová a genová organizace TCR proteinu je podobná jako organizace pozorovaná u molekul imunoglobulinu (Ig) a sdílí mnoho podobných vlastností s Ig navázaným membránou na B-buňky (Allison a Lanier, 1987). Podobně jako Ig musí molekula TCR potenciálně rozpoznávat ohromný počet potenciálních antigenových sekvencí. Z tohoto důvodu jsou organizace a přeuspořádání TCR genu podobné svou komplexností organizace a přeuspořádáním v B-buňkách (Davis a Bjorkman, 1988). Stejně jako je tomu u molekul protilátek produkovaných B-buňkami, zahrnuje generování idiotipické diverzity v T-buňkách množinu kopií proměnných (V) genů v zárodečné přímce, nahodilá přeuspořádání α a β podjednotek a proměnlivost generovanou spoji a inzerty (Davis a Bjorkman, 1988). Nicméně na rozdíl od B-buňek se nezdá, že by T-buňky generovaly diverzitu somatickou mutací, ale pravděpodobnější je, že stejně jako v případě Ig molekuly využívají potenciální repertoár TCR (Lechler a kol., 1990).

TCR, přesto, že je zodpovědný za rozpoznání antigenu, není schopen dopravovat signál (Allison a Lanier, 1987). Konformační změny v TCR, které následují po navázání na antigen presentovaný ve spojení s MHC na antigen předkládající buňce (APC), vedou k tomu, že nekovalentně svázaný komplex povrchových molekul, zahrnujících CD3 a ζ -řetězce, dopraví signál. (Clevers a kol., 1988) Následkem navázání TCR dochází k fosforylaci CD3 komplexu, která

nepřímo vede k Ca^+ vtoku do buňky a iniciaci produkce IL-2 a IL2R (Weiss a Littman, 1994). Tato kaskáda je považována za iniciační událost při aktivaci T buňky.

TCR rozpozná antigen pouze, pokud je prezentován v asociaci s MHC. S antigenovou prezentací v T-buňce jsou spojovány dva podsoubory MHC proteinů. MHC I. tř. se nachází na téměř všech buňkách těla majících jádro a fungují tak, že na svém povrchu exponují endogenně vyprodukované peptidy (Matasumura a kol., 1992). Peptidy exponované ve spojení s MHC I. tř. jsou rozpoznány T-buňkami exprimujícími CD8 v asociaci s TCR (Littman, 1987). Úkolem CD8^+ T-buněk v systému regulujícím imunitu je odstraňovat virem infikované buňky a zhoubná místa. Rozpoznání molekul v asociaci s MHC CD8^+ T-buňkou (peptidů nebo pozměněných samotných peptidů, které by mohly indikovat zhoubné bujení), vyústí v destrukci buňky, která je mediována cytotoxickým T-lymfocytom (CTL) (Berke, 1994).

Molekuly MHC II. tř., tj. druhý histokompatibilní komplex, se zpravidla nacházejí pouze na profesionálních buňkách prezentujících antigen, které zahrnují například B-buňky, makrofágy/monocyty a dendritické buňky, nicméně indukce na některých dalších buněčných populacích vyvolaná specifickými stimuly je možná (Germain, 1993). MHC II. tř. molekula je zodpovědná za prezentaci exogenního antigenu CD4^+ T-buňce. Antigen, který je fagocytován, endocytován nebo se naváže na povrch Ig a absorbován buňkami prezentujícími antigen je endogenně zpracován a navázán na MHC II. tř. (Unanue, 1987). Tato molekula se potom exponuje na povrchu a je okamžitě nabídnuta pro rozpoznání $\alpha\beta$ T-buňkám exprimujícím CD4 (Littman, 1987). Rozpoznání antigenu CD4^+ T-buňkami vyvolá produkci cytokinů a

růstových faktorů nezbytných pro iniciaci a vyhlášení mnoha aspektů účinné imunitní odezvy (Mosmann a Coffman, 1987).

CD4 a CD8 odlišují $\alpha\beta$ T-buněčné podsoubory a definují funkční vlastnosti každé skupiny. Presentace CD4 nebo CD8 na T-buňce je vzájemně se vylučující (Littman, 1987). Po selekci a zrání v thymusu je tedy v $\alpha\beta$ T-buňkách přítomna pouze molekula CD4 nebo CD8. Tyto molekuly stabilizují interakci mezi TCR a antigenem navázaným na MHC a určují zdali T-buňka rozpozná antigen prezentovaný ve spojení s MHC I. tř. nebo II. tř. (Littman, 1987). Vazebná doména molekuly CD4 nebo CD8 rozpoznává příslušné nepolymorfni oblasti molekuly I. tř. nebo II. tř. (Clayberger a kol., 1994). Navázání CD4 nebo CD8 na tyto specifické oblasti stabilizuje interakci mezi TCR a antigenem navázaným na MHC při iniciaci T-buněčné aktivace (Littman, 1987). Funkcí $CD4^+$ T-buněk je pouze vzájemně reagovat s ATC exprimující antigen ve spojení s II. tř. a iniciující odezvu pomocné T-buňky, zatímco $CD8^+$ T-buňky pouze rozpoznávají antigen prezentovaný ve spojení s I. tř. a po navázání iniciují cytotoxickou odezvu (Germain, 1993). Tyto dva odlišné fenotypy pomocných T-buněk a CTL lze diferencovat povrchovou expresí CD4 nebo CD8.

Ačkoliv většina T-lymfocytů nesoucích CD4 je zpravidla považována za pomocné buňky, byl navržen podsoubor $CD4^+CTL$ (Yasukawa a kol., 1989). $CD4^+$ pomocné T-buňky jsou hlavními regulátory imunitní odezvy v tom smyslu, že produkují bakterii stimulačních a supresorových cytokinů (Mosmann a Coffman, 1987). Faktory produkované těmito buňkami jsou důležitými mediátory při iniciaci humorální neboli protilátkou zprostředkované odezvy a buněčné nebo-li hypersenzitivní odezvy zpožděného typu (sekundární)

(Mosmann a Coffman, 1987). K tomu, aby se $CD4^+$ T-buňky aktivovaly a produkovaly rozpustné růstové faktory, je zapotřebí, aby proběhla komplexní kaskáda dějů. Antigen je detekován a endocytován profesionální APC, kterou je zpravidla makrofág (Unanue, 1984). ATC denaturuje protein a láme ho na menší fragmenty, tj. peptidové fragmenty 15 až 18 aminokyselinových zbytků, které se následně navážou na MHC v endoplazmickém retikulu a následně se přepraví na povrch (Rotzschke a kol., 1994). Antigen exponovaný na povrchu je tedy viditelný pro T-lymfocyty a může být rozpoznán T-buněčnými podsoubory se správným TCR idiotypem, které exprimují $CD4$ (Germain, 1993). Jakmile T-buňka rozpozná správný antigen a správné akcesované signály jsou odeslány dojde k diferenciaci panenského lymfocytu a může proběhnout klonální expanze. Do současné doby nebyly zatím stanoveny stimuly vyvolávající preferenční vývoj odezvy typu 1 (buněčné) vs. odezvy typu 2 (humorální) (Mosmann a Coffman, 1989).

Pomoc T-buněk vyžaduje celá řada aktivit jak humorální, tak buněčné odezvy. T-buněčně dependentní buněčná odezva, která je nutná pro produkci protilátky proti většině antigenů, vyžaduje pro správné zrání B-buňky pomoc T-buňky (Chesnut a kol., 1986). Potom, co Ig exponovaný na povrchu B-buňky naváže antigen a potom, co proběhne internalizace, dojde k zpracování těchto antigenů a exprese na povrchu MHC II. tř. (Germain, 1993). Přímý kontakt buňka-buňka mezi $CD4^+$ T-buňkou se správným TCR idiotypem a B-buňkou podpoří aktivaci a proliferaci T-buňky (Chesnut a kol., 1986). Aktivovaná pomocná T-buňka může být schopna podporovat odezvu typu 2 v tom smyslu, že vylučuje faktory nezbyté pro růst a diferenciaci B-buňky (Mosmann a Coffman, 1989). Tyto faktory zahrnují faktory IL-4, IL-5 a

IL-13, které mohou indukovat aktivaci a proliferaci B-buňky a které jsou důležité při isotopickém spouštění Ig molekuly, zatímco IL-10 brání iniciaci odezvy typu 1, která by naopak potlačovala humorální aktivitu (Mosmann a Coffman, 1989). Buněčné odezvy (typ 1) neuzrávají stejným způsobem jako humorální odezvy (typu 2) (Sher a kol., 1992). Po aktivaci a zrání T-buňky pro odezvu typu 1 produkuje T-buňka faktory, které upřednostňují buněčnou imunitu. IL-2 je T-buněčný růstový faktor, který rovněž podporuje CTL odezvy, zatímco IFN γ aktivuje makrofágy, CTL a neutrofily (Wang a kol., 1993).

Pomocné T-buňky jsou tedy schopny přenášet dvě velkou měrou se vzájemně vylučující odezvy. Cytokinový sekreční vzor, který vede k iniciaci humorální odezvy obsahuje faktory, které jsou supresivní pro buněčnou odezvu a naopak (Mosmann a Coffman, 1989). Není zřejmé, co určuje, zda bude T-buňka produkovat vzor typu 1 (IL-2, IFN γ a lymfotoxin) nebo vzor typu 2 (IL-4, 5, 6, 10 a 13) ačkoliv se předpokládá, že typ cytokinového vzoru, který se vyvine, může být ovlivněn typem APC, která prezentuje antigen nebo rozpustnými faktory produkovány APC (Mosmann a Coffman, 1989). Kromě pomocných buněk typu 1 a 2 existuje podsoubor T-pomocných buněk typu 0, jehož sekreční vzory jsou mezi typem ležícím mezi typem 1 a 2 (Gajewski a kol., 1989). Pomocné T-podsoubory byly demonstrovány zejména při *in vitro* experimentálních pracích a mohou být produktem kultury. Kromě toho jsou tyto T-pomocné podsoubory důležitými modely pro určování úlohy pomocné T-buňky při modulaci vývoje specifické odezvy v *in vivo* prostředí.

Druhá $\alpha\beta$ T-buněčná populace je kromě podsouboru pomocných CD4⁺ T-lymfocytů tvořena cytotoxickými lymfocyty

nesoucími CD8. Zdá se, že CD8⁺ CTL je hlavní složkou systému regulujícího imunitu, jejíž primární funkcí je ničit virově a intracelulárně bakteriálně infikované buňky a zhoubné bujení (Berke, 1994). Tyto buňky jsou rovněž schopné produkovat cytokiny, ale zpravidla pouze ty cytokiny, které souvisí s indukcí buněčné odezvy (IL-2, IFN γ a TNF) (Fong a Mosmann, 1990). TCR těchto buněk, ve spojení s CD8, rozpoznávají antigen prezentovaný ve spojení s MHC I. tř. (Littman, 1987). Obecně platí, že všechny buňky opatřené jádrem mají na svém povrchu exponované endogenně syntetizované peptidy prezentující I. tř. (Matasumara, 1992). Konkrétně potom platí, že imunitně upřednostněná místa včetně mozku vykazují nízkou hladinu exprese proteinů, jehož exprese může být v těchto místech vyvolána působením interferonu (Moffet a Paden, 1994). Proteiny produkované v endoplazmickém retikulu normálním metabolismem buňky se denaturují, částečně degradují a naváží na MHC I. tř., na jejímž povrchu se exponují (Engelhard, 1994). Polypeptidy se proteolyticky linearizují a naváží v 9 až 12 kyselinových epitopech na I. tř., na jejichž povrchu se následně exponují (Engelhard, 1994). Všechny endogeny produkované peptidy se na povrchu teoreticky exprimují tímto způsobem, přičemž selekce v thymusu má v ideálním případě za následek eliminaci všech autoreakčních T-buněk a systém regulující imunitu může detekovat přítomnost virově infikovaných nebo transformovaných buněk (Berke, 1993). Rozpoznání cizích peptidů exponovaných I. tř. 1, usnadňují pro antigen specifické T-buněčné receptory na CD8⁺ CTL (Lechler a kol., 1990). Kontakt mezi efektorovou buňkou a cílovou buňkou je pro aktivaci nezbytný (Berke, 1994). Pokud TCR detekuje antigen jako cizí, potom stabilizuje navázání CD8 na I. tř. na infikované buňce interakci mezi oběma molekulami

(Littman, 1987). Po rozpoznání antigenu a aktivaci T-buňky se mezi cílovou buňkou a efektorovou T-buňkou vytvoří konjugát a efektorová buňka se odešle (Taylor a Cohen, 1992). Pokud se tedy samotné proteiny změní nebo pokud buněčnou funkci převezme patogen, potom se peptidy stanou dostupnými pro rozpoznání systémem regulujícím imunitu a tento nástroj imunitního systému může eliminovat chorobné buňky (Berke, 1994).

Zdá se, že buněčnou cytotoxicitu způsobuje jedna ze dvou hlavních drah. Buňka je buď indukována k tomu, aby podstoupila apoptickou smrt, nebo je lizována uvolněním cytotoxických granulí z CTL (Berke, 1993). Apoptóza je v cílových buňkách vyvolána faktory uvolněnými CTL, které indikují genovou expresi, jež má za následek buněčnou smrt (Russel, 1983). Výhodou tohoto mechanismu je, že nedojde k buněčné lýze, a možnost uvolnění potencionálně infekčního obsahu buňky se tímto redukuje (Nagata a Golstein, 1995). Nicméně lýza může být běžnějším mechanismem, pomocí kterého dochází k cílové eliminaci. Perforin, který proniká membránami cílové buňky je hlavní složkou cytotoxických granulí (Liu a kol., 1995). Přesto, že součástí této formy imunitní regulace jsou i další typy buněk zdá se, že CTL, který je považován za hlavní složku antivirové a protinádorové imunity a hlavní složku působící proti specifickým patogenům, je pro ochranu nevyčerpatelný (Kupfer a Singer, 1989).

Z počátku se buněčné povrchové proteiny používaly k rozlišení specifických buněčných populací. V nedávné době byly odvozeny funkční aspekty celé řady těchto molekul a přestože stále zůstávají důležitými prvky pro rozlišení buněčných populací, je stále zřetelnější jejich důležitá úloha ve funkci mnoha buněk.

Různé akcesorní a adhezivní molekuly, které hrají určitou roli při vývoji produktivní imunitní odezvy, jsou exponovány na T-buňkách a buňkách prezentujících antigen (van Seventer a kol., 1991). Adhezivní molekuly jsou určitou měrou exponovány na většině buněk imunitního systému. Jsou důležité pro zachycení buněk v určité oblasti a pro iniciaci a udržení kontaktu buňka-buňka (Mescher, 1992).

CD-2/LFA 3 (CD58) a LFA-1/ICAM-1 jsou dvěma adhezivními molekulovými komplexy, které se podílejí na stabilizaci interakcí T-buňka/APC a na posílení aktivity (Springer a kol., 1987). CD2 je jedním z prvních markerů exponovaných na prekurzorech T-buněk a přežívajících po celou dobu života buňky, zatímco LFA-1 se exprimují na T-buňkách později a množí se v paměťových buňkách nebo indukci (Springer a kol., 1987).

Akcesorní molekulové komplexy vykazují rovněž adhezivní vlastnosti, ale jejich hlavní funkcí je pravděpodobně doprava intracelulárního signálu po navázání ligandu (Anderson a kol., 1988). Po vytvoření interakce mezi receptorem a jeho ligandem dojde ke konfirmační změně ve struktuře molekul, která způsobí odeslání signálu do cytoplazmy jedné nebo obou buněk (Hutchcroft a Bierer, 1994). Signály odeslané těmito molekulami hrají různé role při podpoře vývoje T-buněk, ale v případě absence signálů zprostředkovaných těmito molekulami se T-buňky mohou stát anergickými (Leung a Linsley, 1994).

CD28/CD80 interakce je hlavní složkou produktivní imunitní odezvy zprostředkované T-buňkami (Linsley a kol., 1993a). Interakce CD28 akcesorní molekuly s jejím ligandem CD80 je potřebná pro úplnou aktivaci a proliferaci

panenských T-buněk (Linsley a kol., 1991a). Rovněž se ukázalo, že tato interakce hraje důležitou roly při proliferaci aktivovaných a paměťových CD4⁺ T-buněk a při prevenci před apoptickou buněčnou smrtí (Linsley a kol., 1991a). Objevení interakce a objasnění jejích mechanismů poskytlo důležitý spojovací článek pro pochopení imunity zprostředkované T-buňkami.

Podstata vynálezu

Vynález poskytuje izolovanou a purifikovanou DNA kódující kočičí CD80 (B7-1) ligand, kočičí CD86 (B7-2) ligand, kočičí CD28 receptor nebo kočičí CTLA-4 (CD152) receptor a stejně tak vektory obsahující nukleovou kyselinu kódující kočičí CD80, kočičí CD86, kočičí CD28 nebo kočičí CTLA-4. Vynález rovněž poskytuje hostitelské buňky transformované vektory kódujícími CD80, vektory kódujícími CD86, vektory kódujícími CD28 nebo vektory kódujícími CTLA-4. Vynález dále poskytuje polypeptidy kódované nukleovou kyselinou kočičího CD80, kočičího CD86, kočičího CD28 nebo kočičího CTLA-4.

Vynález poskytuje vakcínu, která obsahuje účinné množství polypeptidů kódovaných nukleovou kyselinou kočičího CD80, kočičího CD86, kočičího CD28 nebo kočičího CTLA-4. Vynález rovněž poskytuje vakcíny, které dále obsahují imunogeny odvozené z patogenů. Vynález poskytuje vakcíny, které jsou schopné zesilovat imunitní odezvu a rovněž vakcíny, které jsou schopny potlačovat imunitní odezvu.

Stručný popis obrázků

Obr. 1A: DNA a aminokyselinová sekvence kočičího CD80 (B7-1) (TAMU). (SEQ ID NO. 1 a 2);

obr. 1B: graf hydrofobicity aminokyselinové sekvence kočičího CD80 (B7-1) (TAMU);

obr. 2A: DNA a aminokyselinová sekvence kočičího CD80 (B7-1) (SYNTRO). (SEQ ID NO. 3 a 4);

obr. 2B: graf hydrofobicity aminokyselinové sekvence kočičího CD80 (B7-1) (SYNTRO);

obr. 3A: DNA a aminokyselinová sekvence kočičího CD86 (B7-2) (SEQ ID NO. 5 a 6);

obr. 3B: graf hydrofobicity aminokyselinové sekvence kočičího CD86 (B7-2);

obr. 4A: DNA a aminokyselinová sekvence kočičího CD28 (SEQ ID NO. 7 a 8);

obr. 4B: graf hydrofobicity aminokyselinové sekvence kočičího CD28;

obr. 5A: DNA a aminokyselinová sekvence kočičího CTLA-4 (CD152) (SEQ ID NO. 9 a 10);

obr. 5B: graf hydrofobicity aminokyselinové sekvence kočičího CTLA-4 (CD152).

Vynález zahrnuje izolovanou nukleovou kyselinu kódující kočičí CD80 ligand nebo kočičí rozpustný CD80 ligand. Vynález rovněž zahrnuje izolovanou nukleovou kyselinu kódující kočičí CD86 ligand nebo kočičí rozpustný

CD86 ligand. Vynález zahrnuje izolovanou nukleovou kyselinu kódující kočičí CD28 receptor nebo kočičí rozpustný CD28 receptor. Vynález zahrnuje izolovanou nukleovou kyselinu kódující kočičí CTLA-4 receptor nebo kočičí rozpustný CTLA-4 receptor.

U jednoho provedení vynález poskytuje nukleovou kyselinu kódující kočičí CD80 ligand, jehož sekvence znázorněna na obr. 1A začíná methioninem a končí threonine (SEQ ID NO: 1). U dalšího provedení vynález poskytuje nukleovou kyselinu kódující kočičí CD86 ligand, který má sekvenci znázorněnou na obr. 3A začínající methioninem a končící glutaminem (SEQ ID NO: 5). U dalšího provedení vynález poskytuje nukleovou kyselinu kódující kočičí CD28 receptor, který má sekvenci znázorněnou na obr. 4A začínající methioninem a končící serinem (SEQ ID NO: 7). U dalšího provedení vynález poskytuje nukleovou kyselinu kódující kočičí CTLA-4 receptor, který má sekvenci znázorněnou na obr. 5A začínající methioninem a končící asparaginem (SEQ ID NO: 9).

U výše uvedených provedení vynálezu je nukleovou kyselinou DNA nebo RNA. U dalšího provedení je DNA kyselina cDNA nebo genomová DNA kyselina.

Vynález poskytuje oligonukleotid tvořený alespoň 12 nukleotidy, jehož sekvence je doplňkem sekvence přítomné ve výše popsané nukleové kyselině kódující CD28, CD80, CD86 nebo CTLA-4. Další provedení vynálezu poskytuje oligonukleotid, jehož délka je tvořena alespoň 15 nebo 16 nukleotidy a jehož sekvence je doplňkem sekvence přítomné ve výše popsané nukleové kyselině kódující CD28, CD80, CD86 nebo CTLA-4.

Další provedení výše popsaného vynálezu poskytuje detekovatelně značený oligonukleotid. U jednoho provedení detekovatelné označení obsahuje radioisotop, fluorofor nebo biotin. U jiného provedení vynálezu je oligonukleotid selektivně methylován.

Vynález poskytuje vektor obsahující nukleovou kyselinu kódující kočičí CD80 ligand nebo kočičí rozpustný CD80 ligand. Další provedení vynálezu poskytuje plasmidový vektor označený jako PSI-B7-1/871-35 (ATCC přístupové číslo 209817). Tento plasmid byl uložen 29.4. 1998 American Típe Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va, 20108-0971, USA podle Budapeštské smlouvy o mezinárodním uznávání uložení mikroorganismů pro účely patentového řízení.

Vynález poskytuje vektor obsahující nukleovou kyselinu kódující kočičí CD86 ligand nebo kočičí rozpustný CD86 ligand. Další provedení vynálezu poskytuje plasmidový vektor označený jako B7-2#19-2/011298 (ATCC přístupové číslo 209821). Tento plasmid byl uložen 29.4. 1998 American Típe Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va, 20108-0971, USA podle Budapeštské smlouvy o mezinárodním uznávání uložení mikroorganismů pro účely patentového řízení.

Vynález poskytuje vektor obsahující nukleovou kyselinu kódující kočičí CD28 receptor nebo kočičí rozpustný CD28 receptor. Další provedení vynálezu poskytuje plasmidový vektor označený jako PSI-CD28 #7/100296 (ATCC přístupové číslo 209819). Tento plasmid byl uložen 29.4. 1998 American Típe Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va, 20108-0971, USA podle Budapeštské smlouvy o

mezinárodním uznávání uložení mikroorganismů pro účely patentového řízení.

Vynález poskytuje vektor obsahující nukleovou kyselinu kódující kočičí CTLA-4 receptor nebo kočičí rozpustný CTLA-4 receptor. Další provedení vynálezu poskytuje plasmidový vektor označený jako CTLA-4# 1/091997 (ATCC přístupové číslo 209820). Tento plasmid byl uložen 29.4. 1998 American Típe Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va, 20108-0971, USA podle Budapeštské smlouvy o mezinárodním uznávání uložení mikroorganismů pro účely patentového řízení.

Vynález poskytuje výše popsaný vektor, který dále obsahuje promotor operačně navázaný na nukleovou kyselinu. U dalšího provedení vynález poskytuje hostitelskou buňku, která obsahuje některý z výše popsaných vektorů. U jednoho provedení je hostitelskou buňkou obsahující jeden z výše popsaných vektorů eukaryotická nebo prokaryotická buňka. U dalšího provedení je hostitelskou buňkou bakterie *E.coli*, kvasnice, COS buňka, PC12 buňka, CHO buňka nebo GH4C1.

Vynález poskytuje polypeptid kódovaný nukleovou kyselinou kódující kočičí CD80 ligand nebo kočičí rozpustný CD80 ligand. Další provedení vynálezu poskytuje polypeptid kódovaný nukleovou kyselinou kódující kočičí CD86 ligand nebo kočičí rozpustný CD86 ligand. Další provedení vynálezu poskytuje polypeptid kódovaný nukleovou kyselinou kódující kočičí CD28 receptor nebo kočičí rozpustný CD28 receptor. Další provedení vynálezu poskytuje polypeptid kódovaný nukleovou kyselinou kódující kočičí CTLA-4 receptor nebo kočičí rozpustný CTLA-4 receptor.

Další provedení vynálezu poskytuje způsob výroby výše popsaných polypeptidů kultivací hostitelské buňky, která exprimuje polypeptidy a izolací takto připravených polypeptidů.

Vynález poskytuje vakcínu obsahující účinné množství výše popsaných polypeptidů a vhodný nosič. U dalšího provedení vynález poskytuje vakcínu, ve které je účinným množstvím výše popsaného polypeptidu množství, které se pohybuje přibližně od 0,01 do přibližně 100,0 mg na dávku. U dalšího provedení vynález poskytuje vakcínu, ve které je účinným množstvím výše popsaného polypeptidu množství, které se pohybuje přibližně přibližně od 0,25 mg/kg tělesné hmotnosti kočky/den do 25 mg/kg tělesné hmotnosti kočky/den.

Vynález dále poskytuje výše popsanou vakcínu, která rovněž obsahuje imunogen odvozený z patogenu. U dalšího provedení se tento imunogen odvodí z kočičího patogenu, viru vztekliny, patogenu Chlamydia, patogenu Toxoplasmosis gondii, patogenu Dirofilaria immitis, blešního patogenu nebo bakteriálního patogenu. U dalšího provedení vynález poskytuje vakcínu, ve které je kočičím patogenem virus kočičí imunodeficiency (FIV), virus kočičí leukémie (FeLV), virus kočičí infekční peritonitidy (FIP), virus kočičí panleukopenie, kočičí kalikivirus, kočičí reovirus typu 3, kočičí rotavirus, kočičí koronavirus, kočičí syncytiální virus, kočičí sarkomavirus, kočičí herpesvirus, kočičí virus Bornovy choroby nebo kočičí parazit.

Vynález poskytuje způsob vyvolání imunitní odezvy u kočky, který zahrnuje podání vakcíny obsahující libovolný zvýše popsaných imunogenů kočky. Vynález rovněž poskytuje z

působ zesílení imunitní odezvy u kočky, který zahrnuje účinné dávky polypeptidu, imunogenu a vhodného nosiče.

Vynález poskytuje způsob podání výše popsané vakcíny subkutánně, intramuskulárně, systemicky, topicky nebo orálně.

Vynález poskytuje způsob potlačení imunitní odezvy u kočky podáním účinného potlačujícího množství kočičí CTLA-4 nukleové kyseliny kódující polypeptid. Vynález poskytuje způsob potlačení imunitní odezvy u kočky podáním účinného potlačujícího množství rozpustného kočičího CD80, kočičího CD86 nebo kočičího CD28 kódujícího polypeptid.

U dalšího provedení vynález poskytuje způsob potlačení imunitní odezvy u kočky podáním přibližně 0,25 mg/kg tělesné hmotnosti/den až 25 mg/kg tělesné hmotnosti/den kočičí CTLA-4 nukleové kyseliny kódující polypeptid. U dalšího provedení vynález poskytuje způsob potlačení imunitní odezvy u kočky přibližně 0,25 mg/kg tělesné hmotnosti/den až 25 mg/kg tělesné hmotnosti/den kočičí množství rozpustného kočičího CD80, kočičího CD86 nebo kočičího CD28 kódujícího polypeptid.

Vynález rovněž poskytuje způsob potlačení imunitní odezvy u kočky trpící autoimunitní chorobou nebo u kočky, která je příjemcem tkáňového nebo orgánového transplantátu podáním účinného imunitní odezvu potlačujícího množství kočičí CTLA-4 nukleové kyseliny kódující polypeptid.

Vynález rovněž poskytuje způsob potlačení imunitní odezvy u kočky trpící autoimunitní chorobou nebo u kočky, která je příjemcem tkáňového nebo orgánového transplantátu, podáním účinného imunitní odezvu potlačujícího množství

rozpustného kočičího CD80, kočičího CD86 nebo kočičího CD28 kódujícího polypeptidu.

Vynález poskytuje izolovanou a purifikovanou kočičí CD80 (B7-1) cDNA obsahující přibližně 941 nukleotidů. Vynález rovněž poskytuje izolovaný a purifikovaný kočičí CD80 polypeptid, který obsahuje přibližně 292 aminokyselin, jejichž nativní membránou vázaná nebo zralá forma má molekulovou hmotnost přibližně 33 485 kDa, isoelektrický bod přibližně 9,1 a celkový náboj při pH 7,0 10. Koexprese CD80 s kostimulační molekulou CD28 a nádorovým antigenem nebo antigenem z patogenního organismu má schopnost aktivovat nebo zesilovat aktivaci T-lymfocytů indukující produkci cytokinu stimulujícího imunitu a rovněž má schopnost regulovat růst dalších buněčných typů. Koexprese CD80 s kostimulační molekulou CTLA-4 má schopnost regulovat aktivaci T-lymfocytů.

Vynález poskytuje izolovanou a purifikovanou kočičí CD86 (B7-2) cDNA obsahující přibližně 1176 nukleotidů. Vynález rovněž poskytuje izolovaný a purifikovaný kočičí CD86 polypeptid, který obsahuje přibližně 320 aminokyselin, jejichž nativní membránou vázaná nebo zralá forma má molekulovou hmotnost přibližně 36 394 kDa, isoelektrický bod přibližně 9,19 a celkový náboj při pH 7,0 11,27. Koexprese CD86 s kostimulační molekulou CD28 a nádorovým antigenem nebo antigenem z patogenního organismu má schopnost aktivovat nebo zesilovat aktivaci T-lymfocytů, indukující produkci cytokinů stimulujících imunitu a rovněž má schopnost regulovat růst dalších buněčných typů. Koexprese CD86 s kostimulační molekulou CTLA-4 má schopnost regulovat aktivaci T-lymfocytů.

Kočičí CD80 nebo CD86 podle vynálezu se získají z přírodních nebo rekombinantních zdrojů. Kočičí CD80 nebo CD86 podle vynálezu obsahuje nativní a membránou vázanou formu nebo sekretovanou formu postrádající transmembránovou doménu.

Vynález poskytuje izolovanou a purifikovanou kočičí CD28 cDNA, která obsahuje přibližně 689 nukleotidů. Vynález rovněž poskytuje izolovaný a purifikovaný kočičí CD28 polypeptid, který obsahuje přibližně 221 aminokyselin, přičemž jejich nativní membránou vázaná nebo zralá forma má molekulovou hmotnost přibližně 25 319 kDa, isoelektrický bod přibližně 9,17 a celkový náboj při pH 7,0 9,58.

Vynález poskytuje izolovanou a purifikovanou kočičí CTLA-4 cDNA, která obsahuje přibližně 749 nukleotidů. Vynález rovněž poskytuje izolovaný a purifikovaný kočičí CTLA-4 polypeptid, který obsahuje přibližně 223 aminokyselin, přičemž jejich nativní membránou vázaná nebo zralá forma má molekulovou hmotnost přibližně 24 381 kDa, isoelektrický bod přibližně 6,34 a celkový náboj při pH 7,0 -0,99.

Podle dalšího aspektu poskytuje vynález způsob zesílení imunitní odezvy koček na imunogeny, přičemž tohoto zesílení se dosáhne podáním imunogenu před, po nebo v podstatě současně s podáním kočičího CD80 nebo kočičího CD86, případně společně s kočičím CD28 nebo kočičím CTLA-4, v množství účinném pro zesílení imunitní odezvy.

Podle dalšího aspektu poskytuje vynález způsob potlačení imunitní odezvy koček na imunogen, přičemž tohoto potlačení se dosáhne podáním imunogenu před, po nebo v podstatě současně s podáním kočičího CD80 nebo kočičího



CD86, případně společně s kočičím CD28 nebo kočičím CTLA-4 nebo společně s protismyslnou RNA nebo DNA (celou nebo pouze její částí) kódující kočičí CD80 nebo kočičí CD86 nebo kočičí CD28 nebo kočičí CTLA-4, v množství účinném pro potlačení imunitní odezvy.

Podle dalšího aspektu poskytuje vynález vakcínu pro vyvolání imunitní odezvy na imunogen u koček, přičemž tato vakcína zahrnuje imunogen a účinné množství kočičího CD80 pro zesílení imunitní odezvy. Imunogen se například odvodí z kočičích patogenů, jakými jsou například virus kočičí imunodeficiency, virus kočičí leukémie, kočičí parvovirus, kočičí koronavirus, kočičí leptovirus a další.

Podle dalšího aspektu poskytuje vynález vakcínu pro vyvolání imunitní odezvy na imunogen u koček, přičemž tato vakcína zahrnuje podání DNA nebo RNA imunogenu a DNA nebo RNA kočičích CD80, CD86, CD28 akcesorních molekul v libovolné kombinaci, které kódují proteiny nebo fragmenty proteinů v množství účinném pro modulaci imunitní odezvy.

Kočí CD80 protein má aminokyselinovou sekvenci, která je z 59 % a ze 46 % identická s lidskými, resp. myšími proteiny. Kočí CD86 protein má aminokyselinovou sekvenci, která je ze 68 % a ze 64 % identická s lidskými, resp. králičími proteiny. Kočí CD28 protein má aminokyselinovou sekvenci, která je z 82 % a ze 74 % identická s lidskými, resp. myšími proteiny. Kočí CTLA-4 protein má aminokyselinovou sekvenci, která je z 88 % a ze 78 % identická s lidskými, resp. myšími proteiny. Lidský nebo myší CD80 nebo CD86 protein nemůže funkčně nahradit kočičí CD80, resp. CD86 protein. Kočí CD80, kočičí CD86, kočičí CD28 a kočičí CTLA-4 jsou tedy nová reakční činidla, která jsou potřebná pro regulaci imunity u koček.

Do rozsahu vynálezu spadají T-buňky regulující přídatné molekuly CD80 (B7-1) nebo CD86 (B7-2) nebo CD28 nebo CTLA-4 (CD152) odvozené z kočičích druhů. Vynález poskytuje izolované a purifikované nukleové kyseliny kódující, a to částečně nebo zcela, kočičí CD80 nebo kočičí CD86 nebo kočičí CD28 nebo kočičí CTLA-4 a stejně tak CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 polypeptidy purifikované buď z nativních nebo rekombinantních zdrojů. Kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4, připravené způsobem podle vynálezu, se použijí pro zvýšení účinnosti kočičích vakcín proti nádorům a patogennímu organismu a jako léčivo pro léčení virových a bakteriálních onemocnění u koček. Kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4, připravené způsobem podle vynálezu, se rovněž použijí ke zmírnění onemocnění prostřednictvím hyperaktivní nebo přesměrované imunitní odezvy.

Nukleové kyseliny, vektory, transformanty

Sekvence cDNA kódující kočičí CD80 (SEQ ID NO: 1,), kočičí CD86 (SEQ ID NO: 5), kočičí CD28 (SEQ ID NO: 7) nebo kočičí CTLA-4 (SEQ ID NO: 9) jsou znázorněny na obrázcích 1 až 5 a předpokládané aminokyselinové sekvence kočičího CD80 (SEQ ID NO: 2,), kočičího CD86 (SEQ ID NO: 6), kočičího CD28 (SEQ ID NO: 8) nebo kočičího CTLA-4 (SEQ ID NO: 10) jsou rovněž znázorněny na obrázcích 1 až 5. Označení těchto kočičích polypeptidů jako CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 vychází z částečné homologie aminokyselinové sekvence s lidským nebo myším nebo králičím homologem těchto polypeptidů a ze schopnosti polypeptidů CD80 nebo CD86 vázat se na kočičí CD28 receptor (viz níže) nebo na CTLA-4 a ze schopnosti aktivovat nebo stimulovat, nebo jiným způsobem regulovat, aktivaci T-lymfocytů. Dále, aniž bychom

se chtěli vázat na některou konkrétní teorii, se dá předpokládat, že kočičí CD80 nebo kočičí CD86 polypeptidy rovněž vykazují alespoň jednu z následujících biologických aktivit: aktivaci NK (přirozený killer) buněk, stimulaci zrání B-buněk, aktivaci MHC omezených cytotoxických T-lymfocytů, bujení žírných buněk, interakci s receptory cytokinů a indukci cytokinů regulujících imunitu.

Vzhledem k degeneraci genetického kódu (tj. více kodonů kóduje určité aminokyseliny) mohou aminokyselinové sekvence kočičího CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 znázorněné na obrázcích 1 až 5 kódovat i jiné DNA sekvence, než které jsou znázorněny na obrázcích 1 až 5. Tyto další DNA sekvence zahrnují sekvence obsahující „sekvenčně-konzervativní“ varianty, u kterých změna jednoho nebo více nukleotidů v daném kodonu nemá za následek změnu aminokyseliny kódované v této pozici. Kromě toho lze daný aminokyselinový zbytek v polypeptidu často nahradit bez toho, že by došlo ke změně celkové konformace a funkce přirozeného polypeptidu. Takové „funkčně-konzervativní“ varianty zahrnují neomezujícím způsobem nahrazení aminokyseliny aminokyselinou, která má podobné fyzikálně chemické vlastnosti, jakými jsou například kyselost, zásaditost, hydrofobicita, hydrofilicita, aromatická struktura apod. (například nahrazení lysinu argininem, aspartátu glutamátem nebo glycinu alaninem). Dále lze přidat nebo vynechat aminokyselinové sekvence bez toho, že by došlo ke znehodnocení biologické aktivity molekuly. Na amino- nebo karboxy-konec lze například přidat další aminokyselinové sekvence, které slouží jako purifikační tag, například histidinový tag (tj. umožní jednostupňovou purifikaci proteinu, po které se chemicky nebo enzymaticky odstraní). Alternativně přidané sekvence poskytují pomocné

místo pro navázání na buněčný povrch nebo jiným způsobem mění cílovou buněčnou specifikaci kočičího CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4, a rovněž mohou poskytovat místo pro navázání protilátek.

Do rozsahu vynálezu spadají kočičí CD80 nebo kočičí CD86 nebo kočičí CD28 nebo kočičí CTLA-4 cDNA sekvence, které jsou znázorněny na obrázcích 1 až 5, sekvenčně konzervativní varianty DNA, DNA sekvence kódující funkčně-konzervativní varianty polypeptidů a jejich kombinace. Do rozsahu vynálezu spadají fragmenty kočičího CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4, které vykazují použitelný stupeň biologické aktivity buď samostatně nebo v kombinaci s dalšími sekvencemi nebo složkami. Jak bude vysvětleno níže, metody manipulace se sekvencí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 a určení toho, zda-li daná kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 varianta vykazuje příslušnou stabilitu a biologickou aktivitu pro dané aplikace, nebo zda varianty, které ovlivňují vazebnou aktivitu těchto molekul, vedou ke zvýšení účinnosti, jsou v daném oboru známy. Jak kočičí CD80, tak kočičí CD86 se budou vázat na koreceptor CD28 nebo na koreceptor CTLA-4. Toho lze dosáhnout exprimací a purifikací varianty CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 polypeptidu v rekombinantním systému a provedením testů, které mají stanovit jeho aktivitu ve smyslu stimulace T-buněk a/nebo mají stanovit aktivitu podporující růst v buněčné kultuře a ve zvířatech po provedení zkušebních aplikací. U varianty CD80 se biologická aktivita testuje funkčním navázáním na receptory CD28 nebo CTLA-4. U varianty CD86 se biologická aktivita testuje funkčním navázáním na receptory CD28 nebo CTLA-4. Podobným způsobem se biologická aktivita testuje u varianty CD28 nebo varianty CTLA-4.

Do rozsahu vynálezu rovněž spadají kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 DNA (a polypeptidy) odvozené z dalších kočičích druhů, které zahrnují například domácí kočky, lvy, tygry, gepardy, rysy apod. Sekvence kočičího CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 homologu, které jsou znázorněny na obr. 1 až 5, jsou snadno identifikovatelné screenováním cDNA nebo genomových knihoven pro identifikaci klonů, které se hybridizují na sondy obsahující celou sekvenci znázorněnou na obrázku 1 až 5 nebo její část. Alternativně se expresní knihovny screenují za použití protilátek, které rozpoznají kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4. Aniž bychom se chtěli vázat na některou konkrétní teorii, dá se předpokládat, že geny CD80 nebo CD86 z dalších kočičích druhů budou sdílet přibližně alespoň 70 % homologie s kočičími CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 geny. Do rozsahu vynálezu rovněž spadají DNA, které kódují homolog CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 a které jsou definovány jako DNA kódující polypeptidy, které sdílejí přibližně alespoň 25% aminokyselinovou identitu s kočičím CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4.

Při manipulaci s nukleovými kyselinami podle vynálezu se zpravidla používají metody, které jsou v daném oboru známé a které jsou například popsány v Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2. vydání, Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor) nebo v Current Protocols in Molecular Biology (Eds. Ausubel, Brent, Kingston, More, Feidman, Smith and Stuhl, Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY, NY, 1992).

Vynález rovněž zahrnuje cDNA a RNA sekvence, a to jak smyslné, tak protismyslné. Vynález dále zahrnuje genomové kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 DNA sekvence a lemující sekvence zahrnující neomezujícím způsobem regulační sekvence. Sekvence nukleové kyseliny kódující kočičí CD80,

CD86, CD28 nebo CTLA-4 polypeptid(y) jsou rovněž spojovány s heterologickými sekvencemi zahrnujícími promotory, zesilovače, odezvové prvky, signální sekvence, polyadenylační sekvence, introny, 5'- a 3'- nekódující oblasti apod. Transkripční regulační prvky, které jsou operativně připojeny ke kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 cDNA sekvenci (sekvencím), zahrnují neomezujícím způsobem ty prvky, které mají schopnost řídit expresi genů odvozených z prokaryotických buněk, eukaryotických buněk, virů prokaryotických buněk, virů eukaryotických buněk a jejich libovolné kombinace. Další použitelné heterologické regulační sekvence jsou odborníkům v daném oboru známy.

Nukleové kyseliny podle vynálezu jsou modifikované odborníkům v daném oboru známými metodami s cílem modifikovat jejich stabilitu, rozpustnost, vazebnou afinitu a specifitu. Sekvence jsou například selektivně metylovány. Nukleokyselinové sekvence podle vynálezu jsou rovněž modifikovány pomocí značení, které je schopno poskytnout buď přímo nebo nepřímo detekovatelný signál. Příklady značení zahrnují radioisotopy, fluorescenční molekuly, biotin apod.

Vynález rovněž poskytuje vektory, které zahrnují nukleové kyseliny kódující CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 polypeptid(y), a to částečně nebo zcela. Tyto vektory například zahrnují plasmidové vektory pro expresi v celé řadě eukaryotických a prokaryotických hostitelů. Vektory rovněž výhodně zahrnují promotor operativně navázaný na část kódující kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 polypeptid. Kódovaný kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 polypeptid(y) se exprimuje za použití libovolného vhodného vektoru a hostitelské buňky zde popsáním způsobem nebo jakýmkoliv jiným, v daném oboru známým, způsobem.

Vhodnými vektory pro použití v praxi jsou například YEp352, pcDNA1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), pRc/CMV (Invitrogen) a pSFV1 (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD). Výhodným vektorem pro použití v rámci vynálezu je pSFV1. Mezi vhodné hostitelské buňky lze například zařadit E. coli, kvasinky, COS buňky, PC12 buňky, CHO buňky, GH4C1 buňky, BHK-21 buňky a melanofory obojživelníků. Pro realizaci vynálezu jsou výhodnou hostitelskou buněčnou linií BHK-21 buňky. Vhodné vektory pro konstrukci holé DNA nebo genetických vakcinací zahrnují neomezujícím způsobem pTarget (Promega, Madison, WI), pSI (Promega, Madison, WI) a pcDNA (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Nukleové kyseliny kódující kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 polypeptid(y) se rovněž zavádí do buněk rekombinantním způsobem. Tato sekvence se například mikroskopicky injektuje do buňky, přičemž způsobí homologickou rekombinaci v místě endogenního genu kódujícího polypeptid, jeho analogu nebo jeho pseudogenu, nebo sekvence, která je v podstatě identická se sekvencí genu kódujícího kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 polypeptid. Rovněž lze použít další metody na bázi rekombinace, například nehomologické rekombinace, a delece endogenního genu prováděné homologickou rekombinací, zejména v pluripotentních buňkách.

Vynález poskytuje způsob zesílení imunitní odezvy u koček na imunogen, kterého se dosáhne podáním imunogenu před, po nebo v podstatě současně s kočičím CD80 nebo kočičím CD86, případně s kočičím CD28 nebo s kočičím CTLA-4 v množství účinném pro zesílení imunitní odezvy.

Vynález poskytuje způsob zesílení imunitní odezvy u koček na imunogen, kterého se dosáhne podáním expresního

vektoru, který obsahuje imunogen odvozený z kočičího patogenu a kočičí CD80 nebo kočičí CD86 akcesorní molekuly, případně s kočičím CD28 nebo kočičím CTLA-4 v množství účinném pro zesílení imunitní odezvy.

Vynález poskytuje způsob přesměrování imunitní odezvy u koček na imunogen, kterého se dosáhne podáním expresního vektoru, který obsahuje imunogen odvozený z kočičího patogenu a kočičí CD80 nebo kočičí CD86 akcesorní molekuly, případně s kočičím CD28 nebo kočičím CTLA-4 v množství účinném pro přesměrování imunitní odezvy.

Vynález poskytuje způsob potlačení imunitní odezvy u koček na imunogen, kterého se dosáhne podáním imunogenu před, po nebo v podstatě současně s kočičím CD80 nebo kočičím CD86, případně s kočičím CD28 nebo kočičím CTLA-4 nebo případně s protismyslnou RNA nebo DNA kódující kočičí CD80 nebo kočičí CD86 nebo kočičí CD28 nebo kočičí CTLA-4 v množství účinném pro potlačení imunitní odezvy.

Vynález poskytuje vakcínu pro vyvolání imunitní odezvy u kočky na imunogen(y), která obsahuje imunogen a účinné množství kočičího CD80 nebo kočičího CD86, případně s kočičím CD28 nebo kočičím CTLA-4, pro zesílení imunitní odezvy, nebo účinné množství kočičího CD80 nebo kočičího CD86 s kočičím CTLA-4 pro potlačení imunitní odezvy. U dalšího provedení poskytuje vynález vakcínu, která obsahuje expresní vektor obsahující geny pro imunogen(y) proti kočičím patogenům a geny pro CD80, CD86, případně s kočičím CD28 nebo kočičím CTLA-4, pro zesílení nebo potlačení imunitní odezvy.

Kočíí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 polypeptidy

Kočičí CD80 gen (jehož DNA a aminokyselinová sekvence jsou znázorněny na obrázku 1 a 2) kóduje polypeptid, který je tvořen přibližně 292 aminokyselinami. Kočičí CD86 gen (jehož DNA a aminokyselinová sekvence jsou znázorněny na obrázku 3) kóduje polypeptid, který je tvořen přibližně 320 aminokyselinami. Kočičí CD28 gen (jehož DNA a aminokyselinová sekvence jsou znázorněny na obrázku 4) kóduje polypeptid, který je tvořen přibližně 221 aminokyselinou. Kočičí CTLA-4 gen (jehož DNA a aminokyselinová sekvence jsou znázorněny na obrázku 5) kóduje polypeptid, který je tvořen přibližně 223 aminokyselinami.

Purifikace kočičího CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 z přirozeného nebo rekombinantního zdroje se provádí v daném oboru známými metodami, které zahrnují neomezujícím způsobem iontoměničovou chromatografii, chromatografii s reverzní fází na C4 kolonách, gelovou filtraci, isoelektrickou fokulaci, afinitní chromatografii apod. U výhodného provedení se biologicky účinné kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 získají ve větších množstvích konstrukcí rekombinantní DNA sekvence obsahující kódující oblast pro kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 navázanou na sekvenci kódující 6 C-koncových histidinových zbytků v pSFV1 replikonu (GIBCO/BRL). Tímto plasmidem kódovaná mRNA se syntetizuje pomocí technik, které jsou odborníkům v daném oboru známy, a elektroporací zavede do BHK-21 buněk. Tyto buňky syntetizují a vylučují zralé glykosylované kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 polypeptidy obsahující 6 C-koncových histidinů. Modifikované kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 polypeptidy se purifikují z buněčného supernatantu pomocí afinitní chromatografie za použití pryskyřice, která váže histidin (His-bind, Novagen, Madison, WI).

Kočičí CD80 nebo kočičí CD86 polypeptidy izolované z libovolného zdroje se modifikují v daném oboru známými metodami. Kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 se například fosforyluje nebo defosforyluje, glykosyluje nebo deglykosyluje apod. Zvláště vhodné jsou modifikace, které mění rozpustnost, stabilitu, vazebnou specifikaci a afinitu kočičího CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4.

Chimerické molekuly kočičího CD80, CD86, CD28, CTLA-4

Vynález se rovněž týká výroby chimerických molekul vyrobených z fragmentů kočičího CD80, CD86, CD28 a CTLA-4 v libovolné kombinaci. Zavedení vazebného místa CTLA-4 namísto vazebného místa CD28 například zvýší vazebnou afinitu CD28 a současně zachová zesílení imunitní odezvy.

U jednoho provedení se vazebná místa pro CD80 nebo CD86 na CTLA-4 a CD28 zamění tak, že se vazebná oblast na CD28 nahradí vazebnou oblastí CTLA-4. Výsledným účinkem chimerické CD28 molekuly s CTLA-4 vazebnou oblastí je zvýšení afinity CD28 pro CD80 nebo CD86 a zvýšení hodnoty zesílení imunitní odezvy. U alternativního provedení jsou chimerické molekuly CD80 a CD28 nebo CD86 a CD28 nebo jejich fragmenty vázány membránou a zesilují schopnost těchto molekul posílit imunitní odezvu. U alternativního provedení jsou chimerické molekuly CD80 a CTLA-4 nebo CD86 a CTLA-4 nebo jejich fragmenty vázány membránou a zesilují schopnost těchto molekul potlačit imunitní odezvu. U alternativního provedení jsou chimerické molekuly CD80 a CTLA-4 nebo CD86 a CTLA-4 nebo jejich fragmenty vázány membránou a přesměrovávají imunitní odezvu za účelem dosažení požadovaného účinku.

Kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 protilátky

Do rozsahu vynálezu rovněž spadají protilátky, které jsou specifické pro výše popsané kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 polypeptidy. Tyto protilátky jsou polyklonální nebo monoklonální a diskriminují kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 na úkor jiných druhů, identifikují funkční domény apod. Tyto protilátky jsou běžně vyráběny za použití způsobů a kompozic popsaných v Harlow a Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, a stejně tak za použití imunologických a hybridizačních technologií, které jsou odborníkům v daném oboru známy. Pokud se pro vyvolání imunitní odezvy, specifické pro kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4, použijí peptidy odvozené z přírodních nebo syntetických kočičích CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4, potom se tyto peptidy zpravidla váží na vhodný nosič, jakým je například KLH, a podávají ve vhodném adjuvansu, například Freundově adjuvansu. Výhodně se zvolené peptidy naváží na nosič s lysinovým jádrem, a to v podstatě způsobem, který popsal Tan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 5409-5413. Za použití známých metod se připraví i výsledné protilátky, zejména vnitřní zobrazovací anti-idiotypické protilátky.

U jednoho provedení se purifikovaný kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 použil pro imunizaci myši, po které byla myším odebrána slezina a splenocyty byly použity pro standardní přípravu buněčných hybridů společně s buňkami myelomu a k získání klonů buněk vylučujících protilátky. U výsledných monoklonálních protilátek vylučovaných takto připravenými buňkami se pomocí *in vitro* testů sledovaly následující aktivity: navázání na kočičí CD80, CD86, CD28

nebo CTLA-4, inhibice schopnosti CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 vázat se na receptor a inhibice schopnosti CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 stimulovat T-buňky.

Kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 protilátky se používají k identifikaci a kvantitativnímu stanovení kočičího CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 za použití imunologických testů, jakými jsou ELISA, RIA apod. Kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 protilátky se rovněž používají pro imunodepleci extraktů kočičího CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4. Kromě toho lze tyto protilátky použít pro identifikaci, izolaci a purifikaci kočičího CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 z různých zdrojů a pro provádění subcelulárních a histochemických lokalizačních studií.

Použití

Kočičí CD80 (B7-1) ligand, kočičí CD86 (B7-2) ligand, kočičí CD28 receptor nebo kočičí CTLA-4 (CD152) receptor připravené způsobem podle vynálezu lze úspěšně použít jako vakcíny pro zabránění infekční chorobě nebo pro podporu růstu v homologických nebo heterologických kočičích druzích, například koexprese CD80 nebo CD86 s kostimulačními molekulami CD28 nebo CTLA-4 v libovolné kombinaci a s nádorovým antigenem nebo antigeny z patogenního organismu. Koexprese kočičího CD80 nebo CD86 společně s kočičím CTLA-4 receptorem má schopnost inhibovat aktivaci T-lymfocytů a schopnost potlačit imunitní odezvu. Specifickým příkladem může být koexprese CD80 nebo CD86 spolu s FIV, FeLV nebo FIP odvozenými imunogeny ve virusovém vektoru nebo v DNA expresním vektoru, která pokud se podá formou vakcíny, bude aktivovat, posilovat nebo

regulovat bujení CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů a indukovat cytokiny regulující imunitu, jakými jsou například IL-2, IFN- γ , IL-12, TNF α , IL-6 apod. Dalším specifickým příkladem by mohla být exprese CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 ve virusovém vektoru nebo DNA expresním vektoru, která, pokud se podá jako léčivo, bude regulovat nebo přesměrovávat imunitní odezvu.

Zesílení imunity přes interakci kočičího CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4, nebo inhibice imunitní odezvy přes interakci kočičího CD80 nebo CD86 s CTLA-4 je přirozený způsob regulace, který je výhodnější než přidání cizích látek, které by mohly mít více účinků, v některých případech i škodlivých, na celkový nebo dlouhodobý zdravotní stav. Molekuly CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 se podávají společně s dalšími rekombinantními molekulami, například s molekulami, které kódují antigeny žádoucí pro vyvolání imunity. Kočičí CD80, CD86, CD28 a/nebo CTLA-4 gen se zavede do expresního vektoru a infikuje nebo transfektuje do cílové buňky, kde dochází k expresi genového produktu, který se buď zachytí v plasmové membráně cílové buňky, nebo v buňce prezentující antigen, nebo se vylučuje ven z cílové buňky nebo z buňky prezentující antigen. Expresní vektor, jakým je například plasmid, virus Semliki Forest, poxvirus nebo herpesvirus, přepravuje gen do buňky prezentující antigen. Kočičí CD80, CD86, CD28 a/nebo CTLA-4 gen nebo fragmenty genů v libovolné kombinaci se zavádí do DNA nebo RNA expresního vektoru a injektují do těla kočky a exprimují genový produkt v těle kočky jako „holou“ DNA/RNA nebo genetickou vakcínu. Koexprese imunogenu a CD80, CD86, CD28 a/nebo CTLA-4 v cílové buňce nebo v těle kočky přispívá k aktivaci, zesílené aktivaci nebo regulaci T-lymfocytů, B-lymfocytů a ostatních buněk.

Alternativně by bylo možné exprimovaný protein podat po expresi v prokaryotickém nebo eukaryotickém systému, jakým je například plasmid, virus Semliki Forest, poxvirus nebo herpesvirus, nebo další virusový nebo bakteriální vektor. Kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 proteiny zpravidla fungují zakotvené v buněčné membráně jako akcesorní molekuly plasmové membrány, ale mohou existovat i v dalších formách, například bez membránového ukotvení.

U jednoho provedení jsou kočičí CD80 a kočičí CD86 rozpustné, postrádají transmembránovou doménu nebo hydrofobní oblast a vzájemně reagují s kostimulačními molekulami CD28 nebo CTLA-4 buď v membránou vázané, nebo v rozpustné formě. U alternativního provedení jsou kočičí CD80 nebo CD86 membránou vázané a kostimulační molekuly CD28 nebo CTLA-4 se nacházejí v rozpustné formě postrádající transmembránovou doménu nebo hydrofobní oblast. Rozpustný CD28 nebo CTLA-4, výhodně v dimerní formě, se využívá při léčení choroby koček související s imunosupresí mediovanou T-buňkami. Rozpustný CD28 nebo CTLA-4 brání odhojení transplantované tkáně a lze jej použít při léčení chorob autoimunitního systému. Rozpustný CD28 nebo CTLA-4 lze konkrétně použít jako prevenci proti odhojení transplantátu při transplantaci kostní dřeně. Rozpustný CD28 nebo CTLA-4 brání navázání buňky obsahující membránou vázaný kočičí CD80 nebo CD86.

Sekvenčně konzervativní a funkčně konzervativní varianty kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 DNA a polypeptidů nebo biologicky aktivní kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 fragment nebo subfragment se váží na další sekvenci, jakou je například cytokin, interleukin, interferon, faktor stimulující kolonii, antigen z patogenního mikroorganismu, protilátka nebo purifikační

sekvence, například his-tag nebo reporterový gen, například *E. coli lacZ*, *E. coli iudA* nebo zeleně fluoreskující protein.

Vakcíny

Vynález se týká způsobů a kompozic pro zesílení účinnosti imunitní odezvy u kočičích druhů. U tohoto provedení se kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 použijí ve spojení s imunogenem, pro který je požadováno vyvolat imunitní odezvu. Pro kočičí vakcíny, které například obsahují imunogeny z patogenů, jakými jsou například virus kočičí imunodeficiency a virus kočičí leukémie, a z dalších patogenů, jakými jsou například kočičí parvovirus, kočičí leptovirus a kočičí koronavirus, je žádoucí, aby rovněž obsahovaly kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 a aby regulovaly hodnotu a kvalitu imunitní odezvy. Z těchto důvodů je ve vakcínách obsažen kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 purifikovaný z přírodního nebo rekombinantního zdroje, které již byly popsány výše, a to v množství, které se pohybuje přibližně od 0,01 do 100,0 mg/vakcína/kočka.

Komerční zdroje kočičích vakcín jsou odborníkům v daném oboru známy (Compendium of Veterinary Pharmaceuticals, 1997) a v kombinaci s vynálezem se používají pro přípravu účinnější vakcíny.

Vakcína pro vyvolání a regulaci imunitní odezvy na imunogen u koček je tvořena imunogenem a množstvím kočičího CD80 nebo kočičího CD86, případně s kočičím CD28 nebo kočičím CTLA-4, které je účinné pro zesílení imunitní odezvy nebo s množstvím kočičího CD80 nebo kočičího CD86 s

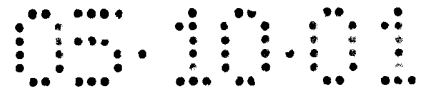
kočičím CTLA-4, které je účinné pro potlačení imunitní odezvy.

Imunogen se zvolí ze skupiny obsahující neomezujícím způsobem kočičí patogeny, například virus kočičí imunodeficiency, virus kočičí leukémie, virus kočičí infekční peritonitidy, virus kočičí panleukopenie (parvovirus), kočičí kalikivirus, kočičí reovirus typu 3, kočičí rotavirus, kočičí koronavirus (Infectious peritonitis virus), virus vztekliny, kočičí syncytiální virus, kočičí sarkomavirus, kočičí herpesvirus (rhinotracheitis virus), kočičí virus Bornovy choroby, Chlamydia, Toxoplasmosis gondii, kočičí parazity, Dirofilaria immitis, blechy, bakteriální patogeny apod.

Regulace růstu nebo regulace aktivace buněčného typu, například T-lymfocytu, naznačuje, že regulovaná odezva buď stimuluje nebo potlačuje buněčný růst. Regulace imunitní odezvy u kočky naznačuje, že při léčení chorob nebo infekčních činidel u koček se imunitní odezva buď stimuluje nebo potlačuje.

Částečná nebo celková exprese kočičího CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4, samotného nebo v libovolné kombinaci, v expresním vektoru obsahujícím gen(y) pro kočičí imunogeny, která je určena pro podání ve formě genetické vakcíny nebo holé DNA vakcíny. Vektory zahrnují neomezujícím způsobem pTarget (Promega, Madison, WI) a pcDNA (Invitrogen, Carlsbad, CA). (Donnelly J.J. a kol., 1997; Hassett a Whitton, 1996).

Celé geny nebo fragmenty genů pro CD80, CD86, CD28 a CTLA-4, samotné nebo v libovolné kombinaci, mohou být zavedeny nebo transfektovány do chromozómu kočky nebo



jiného savce. Takové integrace těchto genů nebo fragmentů těchto genů lze dosáhnout pomocí retrovirového vektoru a tuto integraci lze použít jako určitou formu genové terapie.

Vynález poskytuje způsoby a kompozice pro lékařské a/nebo komerční účely, které zvyšují odolnost proti chorobám kočičích druhů. U tohoto provedení se vhodným způsobem kočkám podává celý kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 exprimovaný, samotný nebo v libovolné kombinaci, nebo jeho část, a to případně v kombinaci s geny kódujícími kočičí imunogeny. Pro podporu růstu nebo navození odolnosti proti chorobě se kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 exprimovaný, samotný nebo v libovolné kombinaci, podává ve formulaci v koncentraci přibližně 0,01 až 100,0 mg/vakcína/kočka a výhodně v koncentraci přibližně od 0,25 do 25 mg/kg/den. Je zřejmé, že požadované množství kočičího CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 lze určit v daném oboru známými a běžně používanými experimenty, například stanovením matrice dávek a frekvencí a porovnáním skupiny experimentálních jednotek nebo subjektů s každým bodem v matrici.

Přirozený nebo rekombinantní kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 se podle vynálezu formuluje s fyziologicky přijatelným nosičem, jakým je například fosfátem pufrovaný solný roztok nebo deionizovaná voda. Formulace může rovněž obsahovat excipienty zahrnující lubrikant(y), změkčovač(a), zesilovač(e) absorpce, bakteriocid(y) apod., které jsou v daném oboru známy. Kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 polypeptid podle vynálezu se podává libovolným účinným způsobem, který představuje například intravenózní, subkutánní, intramuskulární, transmuskulární, topický nebo orální způsob podání. Při subkutánním podání je například

dávka tvořena kočičím CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4 ve sterilním fyziologickém solném roztoku. Při orálním nebo respiračním podání je kočičí CD80, CD86, CD28 nebo CTLA-4, případně společně s excipienty, mikro- nebo makrozapouzdřen, například v liposomech a mikrosférách. Rovněž lze použít dermální náplasti (nebo další pozvolna se uvolňující dávkové formy).

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1A

Klonování kočičí CD80 (B7-1)-TAMU, C86 (B7-2), CD28 a CTLA-4 cDNA:

Kočičí CD80 (B7-1), C86 (B7-2), CD28 a CTLA-4 cDNA se klonovaly nejprve RT-PCR (reverzní transkriptasovou/polymerasovou řetězovou reakcí) amplifikací oblasti mezi dvěma sekvencemi, které se konzervují tak, že vytvoří degenerační primery, které vzájemně působí na kočičí mRNA. Zdrojem mRNA byly jednojaderné buňky periferní krve (PBMC) stimulované alespoň 16 hodin Con A. Tento PCR produkt se sekvencoval. Sekvence se použila pro přípravu primerů pro RACE (rychlou amplifikaci cDNA konců) PCR. 5' Konec se amplifikoval tak, že se nejprve připravila cDNA s downstream primerem komplementárním k nově sekvencované konzervované oblasti. Oligonukleotid se ligoval na 3' konec cDNA (doplňk k 5' konci mRNA). Tato sekvence sloužila jako vazebné místo pro upstream primer, který byl PCR kompatibilní s downstream PCR primerem, který odpovídal další oblasti v nově sekvencované oblasti. Degenerační primery se použily v množině běhů „nested“ reakcí vedoucí k získání 3' konce. Tento upstream primer pro PCR byl navržen tak, aby reagoval

se sekvencí v nově sekvencované oblasti. Produkty se sekvencovaly buď přímo nebo se klonovaly do TA klonovacího vektoru a sekvencovaly z plasmidu. Celý otevřený čtecí rámec se klonoval PCR amplifikací jako celek s primery konstruovanými ze známých sekvencí. ORF se klonovaly a sekvencovaly 3x. B7-1 ORF se subklonoval do pSI plasmidu s SV40 promotorem a do SFV plasmidu. pSI se použil k zajištění funkční interakce mezi B7-1 a kočičím CD28.

DNA primery použitými pro RT/PCR kočičí CD80 (B7-1) cDNA byly:

5' Primer: 5'-CGCGGATCCGCACCATGGGTCACGCAGCAAAGTGGAAC-3';
(SEQ ID NO. 11)

3' Primer: 5'-CCTAGTAGAGAAGAGCTAAAGAGGC-3'; (SEQ ID NO. 12)

(Viz výše kompletní seznam primerů pro kočičí CD80 cDNA.)

DNA primery použitými pro RT/PCR kočičí CD28 cDNA byly:

5' Primer: 5'-CGCGGATCCACCGGTAGCACAATGATCCTCAGG-3';
(SEQ ID NO. 13)

3' Primer: 5'-CGCGGATCCTCTGGATAGGGTCCATGTCAG-3';
(SEQ ID NO: 14)

(Viz výše kompletní seznam primerů pro kočičí CD28 cDNA.)

DNA primery použitými pro RT/PCR kočičí CTLA-4 cDNA byly:

1. Degenerační primery pro první PCR produkt (672 bp):

Deg 5' P: 5'-ATGGCTT(C)GCCTTGGATTT(C)CAGC(A)GG-3';

; (SEQ ID NO. 15)

Deg 3' P: 5'-TCAATTG(A)ATG(A)GGAATAAAATAAGGCTG-3';

(SEQ ID NO. 16)

2. 5' a z CTLA-4 (455 bp): Degenerační, gen-specifické (GSP) a „nested“ gen-specifické (NGSP) primery:

První kolo PCR:

Deg 5' P: 5'-TGTTGGGTTTC(T)G(A)CTCTG(A)CTT(C)CCTG-3';

(SEQ ID NO. 17)

3' GSP: 5'-GCATAGTAGGGTGGTGGGTACATG-3'; (SEQ ID NO. 18)

„Nested“ PCR s PCR produktem z prvního kola:

Deg 5' P: 5'-TGTTGGGTTTC(T)G(A)CTCTG(A)CTT(C)CCTG-3';

(SEQ ID NO. 19)

3' NGSP: 5'-ACATGAGCTCCACCTTGCAG-3'; (SEQ ID NO. 20)

2. 3' konec CTLA-4: Adaptor primer 1 (AP1, Clontech Lab, Inc., Palo Alto, CA); „Nested“ adaptor primer (AP2, Clontech Lab), genově-specifický primer (GSP) a „nested“ genově specifický primer (NGSP):

3' RACE PCR:

AP1: 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'; (SEQ ID NO. 21)

5' GSP: 5'-GTGAATATGGGTCTTCAGGCAATG-3'; (SEQ ID NO. 22)

3' „Nested“ RACE PCR s produktem 3' RACE PCR:

AP2: 5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3'; (SEQ ID NO. 23)

5' NGSP: 5'-GAAATCCGAGTGACTGTGCTGAG-3'; (SEQ ID NO. 24)

3. Primer pro celý CTLA-4 gen

Kočičí CTLA-4 5' Primer: 5'-AACCTGAACACTGCTCCCATAAAG-3';
(SEQ ID NO. 25)

Kočičí CTLA-4 3' Primer: 5'-GCCTCAGCTCTTAGAAATTGGACAG-
3'; (SEQ ID NO. 26)

DNA primery použitými pro RT/PCR kočičí CD86 (B7-2) cDNA
byly:

1. Degenerační primery pro první PCR produkt (423 bp):

Deg 5' P: 5'-TAGTATTTTGGCAGGACCAGG-3'; (SEQ ID NO. 27)

Deg 3' P: 5'-CTGTGACATTATCTTGAGATTTC-3'; (SEQ ID NO. 28)

2. Degenerační primery pro druhý PCR produkt (574 bp)

Deg 5' P: 5'-GA(G)CA(T)GCACT(A)ATGGGACTGAG-3';
(SEQ ID NO. 29)

Deg 3' P: 5'-CTGTGACATTATCTTGAGATTTC-3'; (SEQ ID NO. 30)

3. 5' konec CD86: AP1, AP2 (Clontech Lab); Degenerační 3'-
genově specifický (GSP) a 3'- „nested“ genově specifický
(NGSP) primer:

5' RACE PCR:

AP1: 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'; (SEQ ID NO. 31)

3' GSP: 5'-TGGGTAACCTTGTATAGATGAGCAGGTC-3';
(SEQ ID NO: 32)

„Nested“ 5' RACE PCR s PCR produktem 5' RACE:

AP2: 5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3'; (SEQ ID NO. 33)

3' NGSP: 5'-CAGGTTGACTGAAGTTAGCAAGCAC-3';

(SEQ ID NO. 34)

4. 3' konec B7-2: AP1, AP2, 5' GSP a 5' NGSP:

3' RACE PCR:

AP1: 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'; (SEQ ID NO. 35)

5' GSP: 5'-GGACAAGGGCACATATCACTGTTTC-3'; (SEQ ID NO. 36)

„Nested“ 3' RACE PCR s PCR produktem 3' RACE:

AP2: 5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3'; (SEQ ID NO. 37)

5' NGSP: 5'-CAGTGCTTGCTAACTTCAGTCAACC-3';

(SEQ ID NO. 38)

Celý CD86 gen:

Kočičí B72 (1) 5' Primer: 5'-CGGGAATGTCCTGAGCTTATAG-3';

(SEQ ID NO. 39)

Kočičí B72 (1176) 3' Primer: 5'-GATCTTTTTCAGGTTAGCAGGGG-3'; (SEQ ID NO. 40)

Příklad 1B

Klonování CD80 (B7-1)-Syntro/SPAH, Plasmid 917-19-8/16

Buňky kočičí slinivky se extrahovaly z koček a kultivovaly 5 hodin s Concanavalin A. Potom se buňky peletovaly, propláchly PBS a použily k izolaci celé RNA. (Qiagen Rneasy Total RNA System). Na celou RNA se působilo DNase I (Boehringer Mannheim) ve snaze odstranit DNA kontaminaci z RNA přípravků. Z těchto přípravků se následně extrahovala mRNA za použití Qiagen's Oligotex perliček

(Santa Clara, CA) a rychlých kolon. cDNA se generovala z mRNA v přítomnosti nahodilých hexamerů, dMTPs, RNAsin, reverzní transkriptasy (Promega) a reverzního transkriptasového pufu (Promega) a 30 minut inkubovala při 42 °C. PCR se následně použila pro generování dvojité šroubovice cDNA klonu kočičího B7-1 otevřeného čtecího rámce v celé jeho délce za použití smyslového primeru 5/97.50 (5'-ATGGGTCACGCAGCAAAGTG-3'); (SEQ ID NO. 41) a protismyslového primeru 5/97.51 (5'-CTATGTAGACAGGTGAGATC-3'); (SEQ ID NO. 42), dNTPs, B7-1 cDNA (1. řetězec) MgSO₄ „vent“ polymerasy (BRL) a „vent“ polymerasového pufu (BRL). PCR podmínky byly následující: 1 cyklus 94 °C, 15 s; 35 cyklů 94 °C 30 s, 48 °C 2 min, 72 °C 2 min; 1 cyklus 72 °C 10 min. PCR reakce probíhaly na 1% nízkotavném agarosovém gelu a DNA fragmenty odpovídající očekávané velikosti B7-1 ORF se izolovaly, gelově purifikovaly (Qiagen's Gel Purification Kit, Santa Clara, CA) a klonovaly do pCR-BLUNT plasmidového vektoru za použití kitu reagensií z Invitrogen's Zero Blunt PCR Cloning Kit (San Diego, CA).

DNA extrahovaná z kanamycinově resistantních bakteriálních kolonií se „prescreenovaly“ na přítomnost unikátního *NheI* místa (obsaženého v kočičí CD80 (B7-1)-TAMU). Inzerty, které se nacházely v rozmezí velikosti 800 až 900 bp a obsahovaly *NheI* místo, se sekvencovaly za použití ABI fluorescenčních automatizovaných sekvenčních protokolů a zařízení (Perkin-Emmler-Cetus; Applied Biosystems, Inc.).

Plasmidový vektor a B7-1 genově specifické primery, které se odvodily z již klonovaného B7-1 genu, se použily pro generování DNA sekvence pCR-Blunt primerů 1/97.36 (5'-

CAGGAAACAGCTATGAC-3'); (SEQ ID NO. 43) a 1/97.37 (5'-AATACGACTCACTATAGG-3'); (SEQ ID NO. 44).

B7-1 genově specifickými primery jsou: 12/96.22

(5'-AACACCATTTTCATCATCCTTT-3'); (SEQ ID NO. 45), 1/97.33

(5'-ATACAAGTGTATTTGCCATTGTC-3'); (SEQ ID NO. 46), 12/96.20

(5'-AGCTCTGACCAATAACATCA-3'); (SEQ ID NO. 47), 12/96.21

(5'-ATTAGAAATCCAGTTCCTGCT-3'); (SEQ ID NO. 48), 1/97.32

(5'-TCATGTCTGGCAAAGTACAAG-3'); (SEQ ID NO. 49), 11/96.32

(5'-ATTCCTGACGTCACCGA-3'); (SEQ ID NO. 50), 11/96.31

(5'-AAGGCTGTGGCTCTGA-3'); (SEQ ID NO. 51). Určily se dva klony, které obsahovaly celou délku CD80 sekvence odpovídající původní CD80 sekvenci s výjimkou dvou DNA bodových mutací. Jedna z těchto bodových mutací neovlivnila aminokyselinovou sekvenci. Druhá mutace způsobila změnu aminokyselin z leucinu na isoleucin. Byl navržen výsledný kočičí CD80 klon 917-19.8/16. (CD80-Syntro/SPAH).

Aby se usnadnilo klonování kočičího CD80 (B7-1) genu z libovolným neštovicovým promotorem obsahujícím *EcoRI* a *BamHI* klonovací místa, byly navrženy dva nové primery pro zavedení *EcoRI* a *BamHI* restrikční enzym klonujících míst na 5' resp. 3' konec CD-80 ORF. Těmito dvěma primery jsou: smyslný primer 1/97.43 (5'-TCGAGAATTCGGGTCACGCAGCAAAGTGG-3'); (SEQ ID NO. 52) a protismyslný primer 1/97.6 (5'-GCTAGGATCCAATCTATGTAGACAGGTGAGAT-3'); (SEQ ID NO. 53). Výsledný PCR fragment se digeroval *EcoRI* a *BamHI* a klonoval do O1L SPV homologního vektoru (*AccI* inzertní místo v *HindIII* M genomovém fragmentu viru neštovic prasat) s cílem generovat rekombinantní SPV virus. Výsledkem byla kazeta 930-23.A1 SPV O1L homologního vektoru obsahujícího kočičí CD80 ORF za pozdním/časným syntetickým neštovicovým promotorem LP2EP2 a sousedícím s *E. coli* lacZ markerovou genovou kazetou podporovanou syntetickým pozdním

neštovicovým promotorem LP2. Plasmidový vektor 930-23.A1 se kotransfektoval SPV 001 ve snaze generovat rekombinantní SPV virus exprimující kočičí B7-1 a *E.coli* β -galaktosidasový protein.

Příklad 1C

Subklonování CD-28 do neštovicového virového homologního vektoru

Kódovací oblast kočičího CD28 se PCR amplifikovala se syntetickými primery obsahujícími běžná klonovací místa ve snaze usnadnit klonování CD28 za libovolným neštovicovým promotorem při konstrukci neštovicového specifického homologního vektoru. Ve snaze zavést *EcoRI* a *BglIII* klonovací místa na 5' resp. 3' konec PCR fragmentu se připravily dva syntetické primery. Těmito dvěma primery jsou: smyslný primer, 7/97.1 (5'-GATGAATTC-CATGATCCTCAGGCTGGGCTTCT-3'); (SEQ ID NO. 54) a protismyslný primer 7/97.2 (5'-GATCAGATCTCAGGAACGGTATGCCGCAA-3'); (SEQ ID NO. 55). Výsledný PCR fragment se digeroval *EcoRI* a *BglIII* a klonoval do O1L SPV homologního vektoru s cílem generovat rekombinantní SPV virus. Výsledkem byla kazeta 930-26.A1 SPV O1L homologního vektoru obsahujícího kočičí CD80 ORF za pozdním/časným syntetickým neštovicovým promotorem LP2EP2 a sousedícím s *E. coli* lacZ markerovou genovou kazetou podporovanou syntetickým pozdním neštovicovým promotorem LP2. Homologní plasmidový vektor 930-26.A1 se kotransfektoval SPV 001 ve snaze generovat rekombinantní SPV virus exprimující kočičí CD28 a *E.coli* β -galaktosidasový protein.

Příklad 2

Charakterizace kočičí CD80 (B7-1) -TAMU, CD86 (B7-2), CD28, CTLA-4 a CD80 (B7-1) -Syntro/SPAH cDNA a polypeptidů:

Izolovaná a purifikovaná CD80 (B7-1) cDNA o délce přibližně 941 nukleotidových kódů pro otevřený čtecí rámeček kočičího CD80 polypeptidu o délce přibližně 292 aminokyselin, jejíž přirozená membránou vázaná nebo zralá forma má molekulovou hmotnost přibližně 33 485 kDa, isoelektrický bod přibližně 9,1, celkový náboj při pH 7,0 10,24. Transmembránovou doménou proteinu jsou aminokyseliny přibližně 241 až 271.

Kočičí CD80-TAMU a kočičí CD80-Syntro/SPAH jsou cDNA a polypeptidy nezávisle izolované ze dvou různých zdrojů a jejich aminokyselinové sekvence se mírně liší. Zdrojem CD80-TAMU mRNA byly kočičí jednojaderné buňky periferní krve stimulované ConA a zdrojem CD80-Syntro/SPAH RNA byly buňky kočičí sleziny stimulované ConA. Rozdíly mezi cDNA sekvencí CD80-TAMU a CD80-Syntro/SPAH jsou T a C v nukleotidu 351 a C a A v nukleotidu 670. Změna v nukleotidu 351 je v aminokyselinové sekvenci tichou změnou, zatímco změna v nukleotidu 670 vede ke konzervativní změně neutrální aminokyseliny leucinu na isoleucin v aminokyselinovém zbytku 224.

Izolovaná a purifikovaná CD86 (B7-2) cDNA o délce přibližně 1176 nukleotidových kódů pro otevřený čtecí rámeček kočičího CD86 polypeptidu o délce přibližně 320 aminokyselin, jejíž přirozená membránou vázaná nebo zralá forma má molekulovou hmotnost přibližně 36 394 kDa, isoelektrický bod přibližně 9,19, celkový náboj při pH 7,0 11,27.

Izolovaná a purifikovaná CD28 cDNA o délce přibližně 689 nukleotidových kódů pro otevřený čtecí rámec kočičího CD28 polypeptidu o délce přibližně 221 aminokyselin, jejíž přirozená membránou vázaná nebo zralá forma má molekulovou hmotnost přibližně 25 319 kDa, isoelektrický bod přibližně 9,17, celkový náboj při pH 7,0 9,58.

Izolovaná a purifikovaná kočičí CTLA-4 cDNA o délce přibližně 749 nukleotidových kódů pro otevřený čtecí rámec kočičího CTLA-4 polypeptidu o délce přibližně 223 aminokyselin, jejíž přirozená membránou vázaná nebo zralá forma má molekulovou hmotnost přibližně 24 381 kDa, isoelektrický bod přibližně 6,34, celkový náboj při pH 7,0 -0,99.

Koexprese CD80 s kostimulačními molekulami CD28 nebo CTLA-4 a nádorového antigenu nebo antigenu z patogenního organismu má schopnost aktivovat nebo zvyšovat aktivitu T-lymfocytu, konkrétněji Th-1 lymfocytů, a podporovat růst dalších buněčných typů. Koexprese CD80 s kostimulační molekulou CTLA-4 má schopnost potlačit aktivitu T-lymfocytů, konkrétněji Th-1 lymfocytů. Koexprese CD86 s kostimulačními molekulami CD28 nebo CTLA-4 a nádorového antigenu nebo antigenu z patogenního organismu má schopnost aktivovat nebo zvyšovat aktivitu T-lymfocytu, konkrétněji Th-1 lymfocytů, a podporovat růst dalších buněčných typů. Koexprese CD28 s kostimulační molekulou CD86 má schopnost potlačit aktivitu T-lymfocytů, konkrétněji Th-1 lymfocytů.

DNA a AA sekvenč- ní % identita	Humánní homolog. (DNA sekvenč- ní) % identita	Humánní homolog. (AA sekvenč- ní) % identita	Myší homolog. (DNA sekvenč- ní) % identita	Myší homolog. (AA sekvenč- ní) % identita	Králičí homolog. (DNA/AA sekvenč- ní) % identita	Kuřecí homolog. (DNA/AA sekvenč- ní) % identita
Kočičí CD80	77	59	62	46	--	--
Kočičí CD86	72	68	--	--	67/64	--
Kočičí CD28	85	82	77	74	84/84	59/50
Kočičí CTLA-4	88	88	79	78	--	--

Příklad 3

Použití kočičího CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD28 a CTLA-4 ve vakcínách

Cílem následujících experimentů je zhodnotit schopnost CD80, CD86, CD28 a CTLA-4 v kočičích vakcínách zvyšovat imunitu.

U alternativního postupu se kočkám ve věku 8 týdnů intramuskulární injekcí podalo 100 µg plasmidu obsahujícího cDNA pro kočičí CD80, CD86, CD28 a CTLA-4 molekuly ve směsi s plasmidem obsahujícím cDNA pro FIVenv a gag nebo FeLVenv a gag, nebo se alternativně těmto kočkám intramuskulární injekcí aplikovalo 100 µg plasmidu obsahujícího cDNA exprimující párové kombinace CD80 a CD28 nebo CD80 a CTLA-4 nebo CD86 a CD28 nebo CD86 a CTLA-4 spárované s CD28 a CTLA-4 ve směsi s plasmidem obsahujícím cDNA pro FIVenv a

gag nebo FeLVenv a gag. Kontrolní kočky nepřijaly CD80, CD86, CD28 ani CTLA-4. Kočky se infikovaly provokační injekcí virulentního FeLV nebo FIV a podrobily se pozorování, které mělo odhalit příznaky výše popsaných onemocnění. Výsledky těchto experimentů s provokační injekcí byly následující: kočky přijímající cDNA vektor obsahující kočičí CD80, CD86, CD28 a CTLA-4 a cDNA vektor obsahující FIV geny nebo FeLV geny vykazují 100% ochranu před onemocněním v porovnání s kočkami, které přijaly pouze cDNA vektor obsahující FIV geny nebo FeLV geny a které vykazovaly pouze 75% ochranu před onemocněním.

U alternativního postupu se kočkám ve věku 8 týdnů intramuskulární injekcí aplikovalo 0,1 mg až 100 mg purifikovaného proteinu pro kočičí CD80, CD86, CD28 a CTLA-4 molekuly nebo alternativně párových kombinací CD80 nebo CD86 spárovaných s CD28 nebo CTLA-4 proteiny z výše popsaných rekombinantních cDNA vektorů a opět intramuskulární injekcí aplikovalo 0,1 mg až 100 mg subjednotkové vakcíny obsahující FIVenv a gag nebo FeLVenv a gag. Kontrolní kočky nepřijaly CD80, CD86, CD28 a CTLA-4. Kočky se infikovaly virulentním FIV kmenem nebo FeLV kmenem a podrobily se pravidelným pozorováním zaměřeným na vývoj onemocnění. Výsledky experimentů s provokační injekcí byly následující: kočky přijímající purifikovaný protein pro kočičí CD80, CD86, CD28 a CTLA-4 a subjednotkovou vakcínu obsahující FIV a FeLV vykazují podstatně nižší počet výskytu onemocnění v porovnání s kočkami, které přijímaly pouze subjednotkovou vakcínu obsahující FIV a FeLV proteiny.

Příklad 4

Použití kočičího CD80, CD86, CD28 a CTLA-4 k inhibici a ničení růstu nádorových buněk

Nádorové buňky odebrané z těla kočky se transfektovaly virovým vektorem exprimujícím kočičí CD80 nebo CD86 v kombinaci s CD28 nebo CTLA-4. Transfektované nádorové buňky se podaly kočce a přítomnost CD80, CD86, CD28 a CTLA-4 na povrchu nádorové buňky vyvolala širokou imunologickou odezvu na transfektované a netransfektované nádorové buňky, která způsobila usmrcení lokalizovaných a metastatických nádorových buněk. Při alternativním postupu se přímo do nádoru, který se nachází v těle kočky, injektovaly vektory exprimující kočičí CD80 nebo CD86 v kombinaci s CD28 nebo CTLA-4, což vyvolalo širokou imunologickou odezvu na nádorové buňky, která způsobila usmrcení lokalizovaných a metastatických nádorových buněk.

Příklad 5

Klonování a sekvencování kočičí CD80 cDNA

Úvod

Ukázalo se, že kromě cytokinů existují i některé další molekuly na povrchu buněk, které zvyšují nebo potlačují distinkční imunitní odezvu. CD80 (B7-1) je akcesorní molekulou, která váže na T-buňky svůj receptor CD28 (Freeman a kol., 1989). Tyto interakční funkce při odesílání sekundárních stimulů, vyvolají ve spojení s primárním signálem vyslaným při rozpoznání antigenu prezentovaného ve spojení s MHC T-buněčným receptorem aktivitu a proliferaci T-buněk (Allison a Lanier, 1994).

Přesto, že byl CD80 prvně popsán jako antigen B-buněk bylo později zjištěno, že se exprimuje na celé řadě různých buněčných typů, nejčastěji se schopností prezentovat antigen (Freeman a kol., 1989).

U primátů a hlodavců je CD80 molekulou 60kDa polypeptid tvořený přibližně 290 aminokyselinami (Freedman a kol., 1987; Freeman a kol., 1989). Při potvrzení domnělé aminokyselinové sekvence byly zjištěny vlastnosti, které tuto sekvenci řadí do imunoglobulinové superrodiny (IgSF) (Peach a kol., 1995). CD80 je tvořen dvěma extracelulárními IgSF doménami, hydrofobní transmembránovou doménou a krátkým cytoplazmatickým koncem (Freeman a kol., 1989). Extracelulární doména zralého peptidu má oblast 124 zbytkových NH₃ koncových IgSF proměnných (V), za kterou následuje doména 100 aminokyselinových IgSF konstant (C) (Freeman a kol., 1989). Lidský doplněk má 8 potenciálních N-navázaných glykosilačních míst a přestože je tento zralý peptid vysokou měrou glykosilován, nepodílejí se tyto uhlohydrátové zbytky na navázání na CD28 nebo CTLA-4, protože jsou orientovány opačně než navrhovaná vazebná doména (Bajorath a kol., 1994). Kromě toho se zdá, že odstranění uhlohydrátových zbytků nemá vliv na vazebné schopnosti a spíše se předpokládá, že jejich funkcí je zvyšování rozpustnosti extracelulární části molekuly (Linsley a kol., 1994a).

CD80 se váže na dva distinkční receptory exprimované v různých časových okamžicích v průběhu aktivace T-buňky. CD28 se nachází na celé řadě thymocytů a panenských a aktivovaných T-buněk a hraje prokazatelnou roli při aktivaci a proliferaci T-buněk (Aruffo, 1987). Druhý CD80 receptor CTLA-4 se zpravidla objevuje později na zcela aktivovaných T-buňkách (Linsley a kol., 1991b). Přesto, že

úloha CTLA-4 nebyla doposud definitivně určena, dá se hypoteticky předpokládat, že tato molekula může potlačovat odezvu aktivních a existujících T-buněk. (Hutchcroft a Bierer, 1996).

Nezdá se, že by samotná molekula CD80 měla signální kapacitu. Cytoplazmatická oblast je relativně krátká a neobsahuje žádné zbytky s prokazatelně signalizační nebo enzymatickou funkcí. (Hathcock a kol., 1994). Nedostatek konzervace v cytoplazmatickém konci mezi myším a lidským peptidem rovněž odráží pravděpodobnost, že CD80 postrádá signalizační funkci a působí pouze jako vazebné činidlo pro CD28 nebo CTLA-4 (Linsley a kol., 1994a).

Ukázalo se, že pro zrání panenských T-buněk a pro jejich aktivaci a tedy pro iniciaci primární T-buněčné odezvy je nezbytná interakce mezi CD80 a CD28 (Damle a kol., 1988). Přesto, že CD80 byl prvně identifikován na aktivovaných B-buňkách (Freedman a kol., 1987), byl později nalezen i na většině podsouborů profesionálních buněk prezentujících antigen včetně makrofágů/monocytů (Freedman a kol., 1987), Langerhanových buněk (Symington a kol., 1993), dendritových buněk (Liu a kol., 1992), aktivovaných T-buněk (Razi-Wolf a kol., 1992) a celé řadě různých nádorových linií (Chen a kol., 1992). Ukázalo se, že přítomnost CD82 molekuly na APC je důležitá pro aktivaci, jak $CD4^+$, tak $CD8^+$ T-buněk (Al lison a Lanier, 1994; Bellone a kol., 1994). Ačkoliv se tato molekula za normálních podmínek nachází na profesionální APC v nevýznamných koncentracích, některé nádorové buněčné linie vykazují posílení signalizační molekuly (Chen a kol., 1992).

Zdá se, že v odezvě na transformaci některé onkogenní linie zvyšují exprese CD80. U těchto nádorů odvozených z non-antigen prezentující buňky a rovněž v některých imortalizovaných buněčných liniích se CD80 povrchově exprimuje v koncentracích dostatečných pro podporu úplné aktivace T-buňky. (Chen a kol., 1992). Přestože kinetika exprese není objasněná je možné, že CD80 odvozené z nádoru může být odezvou na „onkogenní inzult“ a evoluční mechanismus, pomocí kterého může imunitní systém odstranit transformované nebo tumorgenních buněk. (Antonia a kol., 1995).

Zdá se, že při primární aktivaci T-buněk hraje důležitou roli interakce CD28-B7. Rozpoznání antigenu v kontextu s MHC TCP je pro iniciaci optimální proliferace a aktivace T-buněk samo o sobě nedostatečné (Schwartz, 1992). TCRT stimulace za absence akcesorních signálů může v T-buněčné populaci vést ke stavu anergie nebo hyporesponsivity (Jenkins a kol., 1987). Navázání molekuly CD28 na T-buňku s molekulou CD80 na buňce prezentující antigen vyvolává sekundární signál potřebný pro aktivaci T-buňky (Schwartz, 1992). Při zapojení TCR za absence tohoto druhého signálu se panenské buňky neaktivují a mohou se stát anergickými (Lanier a kol., 1995). Tato důležitá role CD28-CD80 interakce byla jasně definována nejen při aktivaci panenských CD4⁺ buněk, ale rovněž při aktivaci CD4⁺ Th1 a Th2 klonů a panenských a paměťových CD8⁺ buněk odvozených z malých klidových periferních krevních lymfocytů (Linsley a kol., 1993a).

Pokud jde o CTLA-4/CD28 rodinu existuje ještě alespoň jeden další protireceptor CD80. Počáteční studie, které se snažily demonstrovat důležitost CD80 v primární imunitní odezvě, narazily na problémy, protože přestože zavedení

CTLA-4 Ig inhibovalo imunitní odezvy, přidání nukleární protilátky k CD80, jak se zdá, nepřineslo analogické výsledky (Lenschow a kol., 1993). Vývoj CD80 knockout myši vedla k chybnému objevu sekundárního CTLA-4/CD28 receptoru (Freeman a kol., 1993). Byla zde domněnka, že tyto myši sdílejí podobný fenotyp s již rozvinutými CD28 knockouty, které měly neadekvátní T-buněčnou odezvu. (Freeman a kol., 1993). V případě CD80 knockoutu se však ukázalo, že došlo k vývoji normální odezvy a že APC byly schopny poskytnout sekundární signál nezbytný pro T-buněčné zrání. (Freeman a kol., 1993). Na základě těchto výsledků byl hypoteticky odvozen a dokonce izolován sekundární receptor. Zdá se, že následný objev souvisejícího CD86 (B7-2 nebo B7-0) receptoru vyřešil rozpory v případě CD80 knockoutů a ve spojení se strukturní a vazebnou podobností odráží pravděpodobnost, že tyto molekuly sdílejí společnou funkci a původ (Hathcock a kol., 1994).

CD86 (B7-2) vykazuje určitou podobnost s CD80 v tom smyslu, že sdílí strukturně podobnou extracelulární IgSF L-oblast a C-oblast (Freeman a kol., 1993). Nicméně celková homologie mezi molekulami je nižší než 25% s konzervovanými zbytky, které jsou rozptýleny na protilehlých stranách obou extracelulárních domén (Bajorath a kol., 1994). Zatímco vazebná oblast žádné z molekul nebyla definována, byla poskytnuta sekvenční homologie perspektivních oblastí navržených jako potenciální místa interakce (Linsley a kol., 1994a). Navzdory nedostatku konzervace sdílí CD80 a CD86 podobnou vazebnou „chamtivost“ po obou receptorech, ačkoliv CD86 se z CTLA-4 odděluje rychleji (Linsley a kol., 1995a).

Zdá se, že CD86 sdílí podobný expresní vzor s CD80, který se exprimuje na aktivované B-buňce, T-buňce makrofágu

a monocytu (Azuma a kol., 1993a) Kinetika exprese těchto dvou molekul je však mírně odlišná (Hathcock a kol., 1994). Zdá se, že CD86 se v aktivní imunitní odezvě podílí obecně dříve než CD80 a rovněž se zdá, že se CD86 konstitutivně exprimuje na monocytech (Freeman a kol., 1991). CD80 se může objevit až 24 hodin po počáteční stimulaci zatím, co se CD86 objevuje dříve nebo je konstitutivně exprimován v nízkých koncentracích na myeloidních buňkách (Hathcock a kol., 1994). Tyto dva povrchové proteiny evokují podobné intracelulární odezvy, pokud se navážou na své příslušné receptory na CD4⁺ T-buňkách nebo CD8⁺ T-buňkách (Lanier a kol., 1995). Nezdá se, že by existoval nějaký rozdíl ve schopnosti těchto molekul iniciovat aktivaci a proliferaci T-buněk nebo indukovat CTL aktivitu (Hathcock a kol., 1994). Z těchto skutečností tedy vyplývá, že obě molekuly iniciují podobnou signální kaskádu po navázání na CD28 resp. CTLA-4 (Hathcock a kol., 1994). Rovněž se zdá, že navázání obou molekul na příslušné receptory má stejnou kinetiku a nevykazují rozdílné účinky, ale není zcela jasný evoluční význam tohoto „dvouligando/dvoureceptorového“ systému (Lanier a kol., 1995).

CD80 byl původně popsán jako marker pro B-buňky a na B-buňkách stimulovaných lipopolysacharidem (LPS), anti-Ig, anti-CD40, concanavalinem A (Con A), cAMP, IL-2 a IL-4 se nachází jak CD80, tak CD86 ve vysokých koncentracích (Hathcock a kol., 1994). Ukázalo se, že IFN γ a IL-5 zvyšují koncentraci CD86 v myších B-buňkách, ačkoli nejsou dostupná žádná data týkající se humánního systému nebo CD80 v souvislosti s těmito imunoregulátory (Azuma a kol., 1993a). Kinetika exprese obou molekul v B-buňkách se mírně liší. CD86 se exprimuje dříve po stimulaci (6 hodin), zatímco CD80 se exprimuje nejdříve téměř po 24 hodinách a maximální

exprese nedosáhne dříve než po 48 hodinách (Lenschow a kol., 1993). Rovněž se zdá, že zvyšování koncentrace CD80 na B-buňkách je regulováno signalizací zprostředkovanou molekulami MHC II. tř. (Nabavi a kol. 1992). Ukázalo se, že pro povrchovou expresi CD80 jsou rovněž důležité další dva povrchové receptory. Navázání molekuly CD40 exprimované na B-buňce Ig nebo T-buňky exprimující receptor vedou ke zvýšení exprese CD80 (Azuma a kol., 1993b), zatímco navázání Fc receptoru expresi obou molekul snižuje (Barcy a kol., 1995).

CD40 a jeho ligand CD40L byly navrženy jako dráha prostřednictvím, které je regulována exprese CD80 na APC (Page a kol., 1994). CD40 se exprimuje na celé řadě buněčných typů včetně B-buněk, monocytů, dendritických buněk, fibroblastů a humánních endotelových buněk, a jejich exprese na těchto buňkách se může zvýšit v přítomnosti IFN γ (de Boer a kol., 1993). CD40 ligand (CD40L) se exprimuje na aktivovaných CD4⁺ T-buňkách. Ukázalo se, že navázání CD40 pomocí CD40L zvyšuje expresi CD80 v APC, nicméně k indukci exprese v jiných typech buněk exprimujících receptor včetně endotelových buněk nedošlo (Page a kol., 1994).

Přestože CD80 a CD86 molekuly sdílejí méně než 25 % aminokyselinové identity, mají tyto molekuly podobnou strukturu a jsou považovány za vzdálené příbuzné (Freeman a kol., 1993). Homologní zbytky jsou koncentrovány v Ig-podobných doménách s několika konzervovanými zbytky v transmembránové nebo cytoplazmatické doméně (June a kol., 1995). Byla navržena rodina zahrnující B-7 geny, které budou kromě CD80 a CD86 obsahovat butyrofilin (BT), myelin/oligodendrocytový glykoprotein (MOG), kuřecí MHC analog B-G (Lisley a kol., 1994b). BT, MOG a B-G jsou kódovány MHC genovým komplexem, který vytváří potenciální

evoluční vazbu mezi MHC a potřebnými kostimulačními molekulami (Linsley a kol., 1994b).

Klidové myši a humánní T-buňky exprimují nízké koncentrace CD86, zatímco humánní a T-myší buňky (a T-buněčné klony) aktivované anti-CD3 exprimují CD80 a CD86 ve významnějších koncentracích (Hathcock a kol., 1994). Exprese jak CD80, tak CD28 na aktivovaných T-buňkách může odrážet schopnost T-buněk expandovat přes autokrinní kostimulaci (Azuma a kol., 1993b). Jako zajímavé se ukázalo, že CD80 je zvýšenou měrou exprimován na CD4⁺ T-buňkách infikovaných HIV za současného snížení exprese CD28. Toto může být možným mechanismem virové transmise v případě, kdy neinfikované CD4⁺ T-buňky iniciují kontakt mediovaný CD28/CD80 s infikovanými lymfocyty (Haffar a kol., 1993).

Monocyty humánní periferní krve exprimují nízké koncentrace CD80 a vysoké koncentrace CD86 a expozice GM-CSF nebo IFN γ vede ke zvýšení povrchové exprese CD80 i CD86 (Barcy a kol., 1995). LPS je silným spouštěcím prvkem exprese CD80 v monocytech humánní periferní krve (Schmittel a kol., 1994). Data týkající se peritoneálních makrofágů v humánním systému nebyla zaznamenána, nicméně klidové myši makrofágy exprimují nízké koncentrace CD80 a CD86 (Freeman a kol., 1991; Hathcock a kol., 1994). LPS a IFN γ stimulace myších makrofágů zvyšuje povrchovou expresi, zatímco IFN γ v kombinaci s interleukinem 10 snižuje expresi obou receptorů (Ding a kol., 1993).

Dendritické buňky sleziny exprimují nízké koncentrace obou molekul a Langerhanovy buňky exprimují nízké koncentrace CD86, nicméně kultivace má tendenci zvyšovat expresi v obou typech buněk (Larsen a kol., 1994). Zdá se,

že u dendritických buněk je zvýšení CD86 po kultivaci mnohem strmější, probíhá dříve a může hrát důležitější roli při signalizaci zprostředkované dendritickou buňkou (Hathcock a kol., 1994). Je zajímavé, že ačkoliv IL-10 nemá žádný vliv na expresi CD80 v dendritických buňkách, snižuje expresi CD86. (Buelens a kol., 1995). O'Doherty a kol. (1993) uvedl, že zatímco jsou počáteční koncentrace CD80 nízké, obsahují zralé dendritické buňky vyšší koncentrace CD80. Expresí CD80 na Langerhanových buňkách je inhibováno jak IL-10, tak IFN γ , nicméně GM-CSF expozice může inhibici IFN γ zvrátit, ale inhibici IL-10 nikoliv (Ozawa a kol., 1996).

Ukázalo se, že humánní a myší specifické cytokiny regulují expresi CD80 a CD86. IL-4 je silným indukčním prvkem exprese CD86 a prvkem, který snižuje rozsah CD80 na B-buňkách (Stack a kol., 1994), zatímco IFN γ zvyšuje expresi CD86 na celé řadě buněčných typů včetně B-buněk, monocytů a makrofágů (Hathcock a kol., 1994). Přestože se zdá, že IFN γ zvyšuje expresi CD80 v monocytech, je možné, že rovněž působí jako činidlo snižující expresi CD80 makrofágách. IL-10, i v přítomnosti IFN γ , snižuje expresi CD80 a CD86 na monocytech (Ding a kol., 1993). Tato interakce by mohla představovat potenciální mechanismus přechodu z Th1 odezvy (DTH) na Th2 odezvu (humorální). IL-10 však nemá vliv na expresi CD80 na dendritických buňkách (Buelens a kol., 1995). Z toho může dále vyplývat úloha těchto molekul při regulaci podsouboru pomocných T-buněk, protože dendritické buňky se považují za důležité při iniciaci odezvy druhého typu. IL-7 zvyšuje expresi CD80 na T-buňkách, ačkoliv vliv na další buněčné typy nebyl definován (Yssel a kol., 1993). Ukázalo se, že exprese CD80 na B-buňkách je zprostředkovaná navázáním receptoru p75 TNF

receptorů a tuto expresi lze zvýšit přítomností IL-4 (Ranheim a Kipps, 1995). Je zajímavé, že TNF patří do stejné rodiny molekul jako CD40, což je další potenciální iniciátor exprese CD80. Zdá se, že GM-CSE zvyšuje expresi CD80 na povrchu dendritických buněk a Langerhanových buněk, zatímco IFN γ způsobuje pouze zvýšení CD86 v těchto buňkách (Larsen a kol., 1994).

Rozpoznání, navázání a lyze transformovaných a v něm infikovaných cílových buněk CD80⁺ cytotoxickými T-lymfocyty (CTL) byly dlouho považovány za procesy zprostředkované pouze TCR rozpoznání cizích peptidů exprimovaných v kontextu s MHC I. tř. (Berke, 1993). Nedávno se však ukázalo, že kompletní interakce vyžaduje celou řadu různých povrchových molekul exprimovaných jak CTL, tak cílovými buňkami (Mescher, 1992). Klíčovým hráčem při této interakci je CD80 a jeho receptor CD28. Akcesorní signál vysílaný interakcí B7-CD28 vyžadují CD8⁺ malé klidové lymfocyty k diferenciaci do lytického stavu (Mescher, 1992). Nicméně je zajímavé, že po CTL diferenciaci již není tento sekundární signál pro expresi lytických vlastností potřebný (Hodge a kol., 1994).

Již dlouhou dobu je známo, že CTL jsou důležitými mediátory virové imunity. U osob infikovaných HIV, což je spojováno s vysokými koncentracemi CD8⁺ paměťovými CTL specifickými pro *Gag*, *Pol* a *Env* nedochází k žádnému dlouhodobému vývoji a pouze velmi nízký počet kopií HIV DNA a RNA v jednojaderných buňkách periferní krve (Rinaldo, 1995). Na druhou stranu jsou u osob, které se nacházejí v pozdějších stádiích infekce, paměťové CTL (mCTL) vážně sníženy (Zanussi a kol., 1996). Korelace těchto snížení podporuje myšlenku, že mCTL může být hlavním faktorem při regulaci infekce v hostiteli a může hrát významnou úlohu

při vytváření ochranné imunity u neinfikovaných osob (Zanussi a kol., 1996). Patologické korelace s HIV infekcí navíc odrážejí potenciální úlohu CD80 a CD28 při progresi choroby.

Byla rovněž vyslovena domněnka, že CD80 sehrává určitou roli při vývoji patogeneze HIV infekce (Haffar a kol., 1993). T-buňky zpravidla exprimují CD80, ale pouze v nízkých koncentracích a pouze po aktivaci (Schwartz, 1992). Při *in vitro* studiích HIV infekce v all-stimulovaných primárních T-buněčných liniích se ukázalo, že dochází ke snižování exprese CD28 a zvyšování exprese CD80 společně s MHC CII (Haffar a kol., 1993). Ačkoliv tyto jevy nebyly nikterak logicky vysvětleny, lze hypoteticky odvodit potenciální destrukční role. Přítomnost CD80 na povrchu ve spojení s II. tř. by mohlo vést k posílení kontaktu mezi infikovanými T-buňkami a neinfikovanými CD4⁺ buňkami (Haffar a kol., 1993). Kromě toho, že by tato interakce mohla urychlovat přenos mezi T-buňkami, by mohla rovněž zvyšovat rozpoznání mediované CTL a zabíjení prostřednictvím vysílání sekundárního signálu interakcí CD80 na infikované buňce s CD28 exprimovanou CD8⁺ T-buňce (Haffar a kol., 1993). To by mohlo urychlit redukci v CD4⁺ populaci spojené s nástupem nemocí souvisejících s AIDS (Haffar a kol., 1993)

Zdá se, že jak v myším, tak v humánním systému je exprese B7 rodiny proteinů důležitým faktorem při imunitním rozpoznání transformovaných buněk (Chen a kol., 1992). Přes zjištění exprese v některých transformovaných buňkách se ukázalo, že většina nádorů CD80 nebo CD86 za normálních podmínek neexprimuje, tak že je velmi nepravděpodobné, aby došlo k úplnému rozpoznání exprese potenciálně imunogenního nádoru T-buňkami (Chen a kol., 1993). Nicméně transfekční

experimenty prováděné za použití molekuly CD80, které měly posílit tumortrocydní cytolýzu byly úspěšné (Hodge a kol., 1994).

Pro transfekci zhoubných buněk se použily retrovirové a vakcinové vektory exprimující funkční molekulu CD80 (Li a kol., 1994; Hodge a kol., 1994). Tyto buňky exprimující kromě za normálních podmínek špatně rozpoznatelného nádorového antigenu rovněž CD80 se následně zavedly zpět do hostitele, kde se vytvořila buněčná imunitní odezva proti nádorovým antigenům exprimovaným na zhoubných buňkách (Townsend a Allison, 1993). Výsledky těchto experimentů prováděných s některými formami nádorů byly překvapivě účinné. V mnoha případech je hostitel schopen proti zhoubnému bujení vytvořit silnou buněčnou odezvu a je schopen ho regulovat nebo zcela eliminovat (Hodge a kol., 1994). Následné zavedení nádorových buněk s a bez povrchové molekuly CD80 zpět do hostitele vyvolá podobný stupeň protinádorové aktivity (Hodge a kol., 1994). Zdá se tedy, že po vytvoření paměti není molekula CD80 pro zachování odezvy nebo pro její iniciaci při opakovaném zavedení potřebná (Hodge a kol., 1994). Tyto experimenty ukazují, že molekula CD80 je účinným mediátorem buněčné imunity a že ve specifických nádorech mohou být indukovány buněčné odezvy pro pozitivní regulaci zhoubného bujení a pro prevenci před jeho opakovaným vytvořením (Hodge a kol., 1994).

Jak je patrné z vývoje některých forem autoimunity, může mít zvýšená exprese CD80 nežádoucí účinky. Předpokládá se, že CD80 je v synergii s IL-12 důležitým prvkem při ranném vývoji sklerosy multiplex (MS) a že způsobuje T-buněčnou stimulaci a vývoj DTH (Windhagen a kol., 1995). Experimentální autoimunitní encefalomyelitida (EAE) může být částečně inhibována podáním rozpustného CTLA-4Ig

experimentálním subjektům. Inhibice demyelinace zablokováním interakce CD28/CD80 ukazuje na možnou úlohu této interakce při exacerbaci choroby (Arima a kol., 1996).

Důležitá role molekuly CD80 při progresy účinné imunitní odezvy je jasná. Přestože cDNA kódující tento protein byla izolována u hlodavců a primátů, mimo tyto skupiny izolována nebyla. Kočka je důležitým společenským zvířetem a potenciálním modelem retrovirového onemocnění. Klonování imunologických reakčních činidel z kočičích druhů poskytne nástroje pro výzkum těchto onemocnění ve smyslu veterinární důležitosti s potenciální relevancí k progresi choroby nebo z hlediska prevence této choroby u ostatních druhů.

Materiály a metody

Izolace počátečního fragmentu CD80

mRNA Se extrahovala z periferních jednojaderných krvinek (PBMC) stimulovaných 16 hodin Con A za použití RNazolB RNA extrakčního reakčního činidla (Biotexc, Houston, TX). Nejprve se z této RNA pomocí reakce reverzní transkriptázy (RT) používající jako 3' primer oligo dT odvodila cDNA. RNA a oligo dT se 3 minuty zahřívaly na 75 °C s cílem odstranit sekundární strukturu. Potom se přidala RT, dNTP, pufr a destilovaná voda a směs se inkubovala 1 hodinu při 42 °C. Po této inkubaci se vzorek ohřál na dobu 5 minut na 95 °C s cílem inaktivovat RT. Degenerační primery odvozené z koncových oblastí lidských a myších CD80 publikovaných sekvencí (GeneBank, Gaithersburg, MA) se následně použily při počáteční amplifikaci 344

nukleotidového fragmentu kódujícího středovou oblast konstantní domény genu.

5' primer B7-2 GGC CCG AGT A(CT)A AGA ACC GGA C

3' primer B7-3 CAG (AT)TT CAG GAT C(CT)T GGG AAA (CT)TG

Při amplifikaci produktů se použil polymerázový řetězový reakční protokol s horkým startem, který používá Taq polymerasu. Reakční směs postrádající Taq enzym se nejprve po dobu 5 minut ohřívala na 95 °C, tj. provedl se horký start, aby se zabránilo tvorbě dimerních primerů. Před iniciací teplotního cyklu se přidal enzym. PCR Reakční směs se následně ohřála na 30 sekund na 95 °C, což vedlo k roztavení dvouřetězcové DNA. Potom se reakce ochladila na 30 sekund na 42 °C, což usnadnilo temperování degeneračních primerů. Nízká temperační teplota usnadnila navázání primerů, které nebyly 100% homologické. Reakční směs se potom ohřála na 45 sekund na teplotu 72 °C, což je optimální teplota pro to, aby Taq polymerasa prodloužila primer a zkopírovala opačný DNA řetězec. Teplotní cyklus se opakoval 30x. Po třiceti cyklech se použil konečný extenzní krok, při kterém se teplota zvýšila na 7 minut na 72 °C a který usnadnil extenzi všech nekompletních produktů. Po vizualizaci na 1% agarosovém gelu se produkt přes noc ligoval při 16 °C do TA klonovacího vektoru (InVitrogen, San Diego, CA) pro účely sekvencování. 2 ml Ligační reakce se použily pro transformaci kompetentních InvaF' buněk. Transformované bakterie se v pásech nanasly na LB plotny (50 mg/ml ampicilinu) potažené 40 ml 50 mg/ml roztoku x-gal. Následující den se vybraly bílé kolonie, které se naočkovaly do 5 ml LB média obsahujícího 100 mg/ml ampicilinu a nechaly se růst přes noc při 37 °C a při frekvenci protřepávání 225 min⁻¹.

Minipreparáty se připravily na noc starých kulturách s cílem určit klony, které vykazovaly plasmid se správným inzertem. Plasmid se z kultur extrahoval za použití standardní alkalické lyze, přičemž DNA se dále purifikovala fenol/chloroformovou extrakcí (Maniatis a kol., 1982). DNA se vysrážela ve dvou objemech ethanolu a následně digerovala EcoRI. Digesty se vizualizovaly na 1% agarosovém gelu s cílem určit kolonie s plasmidem, který obsahoval správný inzert. Plasmid se potom purifikoval z pozitivních klonů a sekvencoval pomocí S^{35} radiologicky značeného dideoxyterminátoru na bázi sekvenasy (USB, Cleveland, OH) nebo cyklického sekvencování pomocí fluorescenčního barviva jako terminátoru (Perkin Elmer, Norwalk CT). Ze sekvence cDNA se zkonstruovaly specifické 3' a 5' primery, které se použily při 5' rychlé amplifikaci reakcí cDNA konců (RACE) a derivaci 3' sekvence společně s degeneračními primery z 3' nepřenesené oblasti (UTR).

Izolace 5' oblasti CD80

Pro derivaci 5' sekvence genu se použil cDNA amplifikační protokol „Marathon“ (Clonetech, Palo Alto, CA). Z PBMC stimulovaného 12 hodin pomocí Con A a současně 4 hodiny pomocí LPS se připravila mRNA. mRNA se extrahovala za použití ULTRASPEC RNA extrakčního činidla (Biotexc, Houston TX). cDNA se připravila za použití kotvícího oligo dT primeru s degeneračními nukleotidy na 5' konci, jehož cílem je navázat primer na poslední 5' konec poly A konce. Potom se již popsaným způsobem přepsala cDNA. Pomocí T4 DNA ligasy se na cDNA naligovaly specifické linkery. Na cDNA s vnitřním 3' primerem specifickým pro již amplifikovanou oblast:

B7-284: TTA TAC TAG GGA CAG GGA AG

B7-190: AGG CTT TGG AAA ACC TCC AG

a kotvicím primerem komplementárním pro ligovanou linkerovou sekvenci se provedla „Touchdown“ PCR. Parametry „Touchdown“ PCR reakce, při které se použila KlenTaq polymerasová směs (Clontech, Palo Alto, CA) byly následující: 95 °C 5 min 1 cyklus; 95 °C 30 s, 72 °C 30 s a 68 °C 45 s 5 cyklů; 95 °C 30 s, 65 °C 30 s a 68 °C 45 s 5 cyklů; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s a 68 °C 45 s 25 cyklů. Jeden mikrolitr této reakční směsi se naředil 50 mikrolitry vody a 5 mikrolitrů tohoto ředěného roztoku se použilo při „nested“ PCR reakci (95 °C 5 min 1 cyklus; 95 °C 30 s, 65 °C 30 s a 68 °C 45 s 30 cyklů při použití KlenTaq polymerasové směsi) s pro linker specifickým kotvicím primerem a pro gen specifickým 3' primerem na 5' konci počátečního primeru (obr. 6).

B7-20: TTG TTA TCG GTG ACG TCA GTG

B7-135: CAA TAA CAT CAC CGA AGT CAG G

Na 1,5% agarosovém gelu se vizualizovalo 20 mikrolitrů každé reakce a správný fragment se vyříznul z gelu. Odstředováním gelového řezu přes gelový nebulizér a 0,22mikrometrový filtr „Micropure“ (Amicon, Beverly, MA) se z agarosy extrahovala a purifikovala cDNA. Purifikovaná DNA se následně sekvencovala přímo za použití cyklického sekvencování pomocí barviva jako terminátoru. (Perkin Elmer, Norwalk, CN).

Izolace 3'oblasti CD80

3'oblast genu se odvodila zvolením 5 pro gen specifických primerů z 344 ntd. fragmentu a již sekvencované 5'oblasti:

B7-s220: GTC ATG TCT GGC AAA GTA CAA G

B7-50: CAC TGA CGT CAC CGA TAA CCA C

B7-140: CTG ACT TCG GTG ATG TTA TTG G

B7-550: GCC ATC AAC ACA ACA GTT TCC

B7-620: TAT GAC AAA CAA CCA TAG CTT C

Z konvenčních oblastí humánní a myší CD80 3' UTR se následně zvolily degenerační 3'primery.

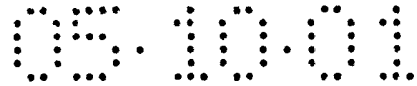
B7-1281 G(A/G)A AGA (A/T)TG CCT CAT GA(G/T) CC

B7-1260 CA(C/T) (A/G)AT CCA ACA TAG GG

cDNA se připravila z RNA extrahované pomocí ULTRASPEC extrakčního činidla (Biotexc, Houston TX) z PBMC stimulované již popsáním způsobem pomocí Con A a LPS.

Ukotvený oligo dT primer se použil jako počáteční 3'primer pro RNA transkripci na cDNA. PCR reakce na bázi Taq polymerasy se prováděly na této cDNA pomocí specifických 5'primerů a degeneračních 3'primerů (95 °C 5 min 1 cyklus; 95 °C 30 s, 42 °C 30 s a 72 °C 45 s 30 cyklů; 72 °C 7 min).

Před přípravou jediného segmentu o správné velikosti bylo třeba provést 2 cykly „nested“ PCR reakcí. Získaný produkt se vyřízl z 1,5% agarosového gelu, purifikoval již popsáním způsobem a cyklicky sekvencoval pomocí terminátoru na bázi barviva (Perkin Elmer, Norwalk, CN).



Ze sekvenčních dat 5' a 3' oblastí se zkonstruovaly primery, které budou amplifikovat oblast kódující celý otevřený čtecí rámeček kočičího CD80 genu:

B7 START: ATG GGT CAC GCA GCA AAG TGG

B7-960: CCT AGT AGA GAA GAG CTA AAG AGG C

Použila se již dříve připravená PBMC cDNA, o které je známo, že obsahuje DNA kódující uvedený gen. Tato PCR reakce (95 °C 5 min 1 cyklus; 95 °C 30 s, 42 °C 30 s a 72 °C 45 s 30 cyklů; 72 °C 7 min), která jako enzymatický koktejl zachycující určitou 5' exonukleasovou aktivitu použila KlenTaq DNA polymerasu ve snaze redukovat náhodné chyby často spojované s Taq polymerasou. Reakce amplifikovala fragment obsahující 960 bazických párů (bp), který se naklonoval do TA klonujícího vektoru (InVitrogen, San Diego, CA) a sekvencoval již popsaným způsobem. Finální sekvence genu obsahovala cDNA ze dvou různých zvířat. Každý bazický pár genu se nezávisle ověřil v alespoň 3 samostatných sekvencích odvozených z jednotlivých PCR reakcí ve snaze redukovat možnost přenosu chyb, které vznikly v rámci PCR reakcí.

Výsledky

V počátečních amplifikačních pokusech s CD80 se použila RNA extrahovaná z experimentální kočky HK5. Další produkty se připravily z jiných zvířat. Počáteční amplifikace HK5 Con A stimulovaná PBMC RNA poskytla 344bp produkt, který sdílel 70% identitu s lidským CD80 genem (obr. 7 a 8). Tyto primery byly specifické pro oblast, která se nacházela ve středu kódovací sekvence odpovídající

IgC doméně. Přesto, že se pro amplifikaci oblastí, které byly kódovány více peptidy použily při těchto počátečních experimentech i další degenerační primery, produkt vhodné velikosti poskytla pouze kombinace B7-2 (5') a B7-3 (3'). Pozdější experimenty používající tyto další degenerační primery s genově specifickými primery byly neúspěšné. Oblast 5'a 3'musely být tedy odvozeny za použití jiných metod.

Na základě sekvenčních dat získaných z počátečního produktu se vytvořila zásoba šesti nových genově specifických primerů (B7-20 5', 135 5', 140 3', 50 3', 284 5' a 190 5'). 3'primery se nejprve použily při 5'RACE PCR, která se do značné míry shodovala s postupem použitým pro úspěšnou amplifikaci 5'oblasti CD28 molekuly. Za použití této metody nebyl vyprodukován žádný produkt.

RACE cDNA amplifikační systém Marathon (Clontech, Palo Alto, CA) úspěšně amplifikoval oblast, která kódovala 5'kódovací sekvenci. Za použití tohoto protokolu se úspěšně amplifikovala RNA odvozená z EK6 Con A stimulované RNA. Počáteční amplifikace se prováděla s B7-284 a B7-3 a kotvícím primerem AP1. Tato reakce neprodukovala definovaný jediný pás tak, že se „nested“ reakce používající tento produkt jako templát prováděly za použití B7-20 a B7-135 jako „nested“ 3'primerů a kotvícího primeru AP-1 jako primeru. Každá z těchto reakcí poskytla produkt o vhodné délce (obr.9).

Sekvenční data odvozená z přímého sekvenování RACA produktů poskytly úplnou identitu ve 20bp a 135bp oblastech, které překryly na počátku sekvenovaný 344bp produkt. Fragменты vybíhaly ze známe oblasti 5'přes 5'ATG startovací kodon kočičího genu do 5'netranslatované

oblasti. Identita mezi 5'kódovací sekvencí odvozenou z těchto produktů a 5'm oblastí humánního CD80 genu byly menší než identita existující mezi 344bp oblastí kočičího genu a analogickou oblastí v humánní oblasti. Bylo pozorováno, že podobný nedostatek homologie existuje i mezi humánní a myší sekvencí ve shodných oblastech. Porovnání sekvenčních dat mimo kódovací oblast ukázalo další významné snížení konzervace (data nejsou uvedena).

Z konvenčních oblastí v 3'UTR humánní a myší sekvence se syntetizovala nová skupina degeneračních primerů kódujících 3'nepřenesenou oblast. Tyto primery úspěšně amplifikovaly cDNA přešpanou z RNA izolované Con A stimulované PBMC z kočky ED3. Na rozdíl od počátečních amplifikačních postupů musela proběhnout série „nested“ reakcí, aby se získal finální produkt. Primární PCR reakce používající tyto degenerační primery a kotvící primer z 344bp fragmentu a 5'oblasti na počátku neposkytly jasné a identifikovatelné pásy (obr.10). Nicméně „nested“ reakce používající řaděný primární produkt a další specifické 5'primery poskytly produkt, který kódoval zbývající 3'oblast (obr. 11).

Po sekvencování 3'produktu se ukázalo, že mimo konstantní oblast je identita opět snížena. Vzdálený konec kódovací sekvence vykazoval velmi nízkou identitu a tato identita se za koncovým kodonem ještě dále snížila.

Z 3'sekvence se zkonstruoval reverzní primer mimo kódovací oblast začínající na nukleotidu 960. Tento konstrukt v kombinaci s primerem obsahujícím výchozí kodon amplifikoval produkt předpokládané velikosti. Sekvencování finálního produktu ukázalo, že se žádná z dříve určených

oblastí ve skutečnosti nepřekrývá a tento fragment poskytl kontinuální a úplnou sekvenci kočičího CD80 genu (obr. 12).

Při amplifikaci finálního produktu se vzorky amplifikovaly z RNA získané z Con A stimulované PBMC zvířat ED3 a EK6. Z každého zvířete se kompletně sekvencovaly alespoň dva produkty a každé nukleokyselinové místo se ověřovalo a potvrdilo alespoň třemi různými správnými čtecími sekvencemi. Produkt ze zvířete EK6 se následně klonoval do TA klonovacího vektoru pro účely dalších referencí a manipulací. Celá nukleokyselinová sekvence je znázorněna na obr. 8. Nukleotidový fragment 960 zahrnuje výchozí kodon v poloze 1, koncový kodon na nukleotidu 888 a 3'nepřemístěnou oblast tvořenou dalšími 72 nukleotidy (obr.13). Z produktů připravených a sekvencovaných tak, aby obsahovaly celý fragment, se sekvencovaly další 5' a 3' oblasti (data nejsou znázorněna). Sekvencování oblastí za 5'výchozím kodonem 5'RACE produktů ukázalo, že ATG v poloze 1 až 3 se nacházely nejprve na methyonovém místě, které odpovídá podobné poloze v myši a humánní sekvenci. Koncový kodon v poloze 888 rovněž odpovídá podobné poloze v dříve sekvencovaných genech. Zarovnání sekvence vykazující 77% resp. 62% identitu s publikovanými humánními a myšimi CD80 nukleokyselinovými sekvencemi je znázorněno na obr.14. Homologie se sekvencemi dalších primátů a hlodavců jsou srovnatelné s homologií platnou pro humánní a myši sekvence. Identita s genem CD86 jednotlivých druhů byla nižší než 25 %.

Pomocí software MacVector DNA analysis (IBI, Rochester, NY) se provedla translace sekvence nukleové kyseliny do aminokyselinové sekvence. Translace poskytla 292aminokyselinový peptid podobné, ale nikoliv stejné délky s myšimi a humánními proteiny (obr.15). Předpokládá se, že

signální peptid probíhá z polohy 1 do polohy 25. Extracelulární oblast molekuly je tvořena 115bázovou IgSF proměnlivou doménou, která probíhá přes zbytek 139 a 100bázovou IgSF konstantní doménou, která dosahuje přibližně ke zbytku 240. Za membránovou doménou, která překrývá oblast mezi zbytky 241 až 271, včetně, následuje krátký cytoplazmový konec tvoření 21 zbytky. Stejně jako v lidské molekule obsahuje kočičí polypeptid 8 potenciálních N-navázaných glykosilačních míst, ačkoliv tyto domény se nenacházejí ve stejných oblastech. Homologie mezi kočičím, lidským a myším peptidem je podstatně nižší než identita pozorovaná u sekvencí nukleových kyselin (tabulka 1).

Tabulka 1: Porovnání sekvenční homologie kočičího CD80 s myším a lidským CD80

Druh	Procento homologie s kočičí sekvencí:	
	Nukleotid	Aminokyselina
Člověk	77%	59%
Myš	62%	46%

Zarovnání navržené peptidové sekvence kočičího CD80 s navrženým lidským proteinem ukazuje, že zdaleka největší homologie mezi těmito dvěma molekulami se nachází v konstantní oblasti (zbytky 140 až 240). V signální sekvenci je nízká homologie mezi peptidy a tento nedostatek identity zasahuje do IgV domény. Jak již bylo zmíněno, konzervace v konstantní doméně je silná, nicméně mezi transmembránovou doménou a intracelulárním cytoplazmatickým koncem kočičího

peptidu a analogickými oblastmi v lidské molekule není identita kontinuální a homologie je velmi nízká (obr.16).

Zarovnání kočičího, lidského a myšího CD80 genu s myším a lidským CD86 genem ukázalo, že ačkoliv mezi těmito dvěma členy B7 rodiny existuje pouze omezená celková homologie zdá se, že zbytky, které indikují B7 genovou rodinu, jsou zachovány kočičím peptidem (obr.17). Tyto molekuly zahrnují zbytky, které se nacházejí ve stočené a pravděpodobně vazebné oblasti.

Přestože homologie mezi lidskou a kočičí CD80 sekvencí není tak velká jako identita mezi dvěma CD28 molekulami, ukázalo srovnání navržených grafů hydrofilicity, že sice existuje celá řada různých změn ve specifické aminokyselinové sekvenci, ale tyto změny jsou často homologické a případně nemění povrchové vlastnosti peptidu (obr. 18).

Diskuse

Identita nukleotidů mezi kočičím a lidským a kočičím a myším CD80 je mírná, ačkoliv se stupeň nukleotidové homologie nepřekládá do peptidu. Zdá se, že zatímco se generuje genetický kód a v některých molekulách (tj. CD28) rozdíly mezi nukleotidovými sekvencemi významně nemění peptid není CD80 konzervace celkové aminokyselinové integrity kritická a evoluční změny v molekule jednotlivých druhů jsou tedy přípustné.

Ačkoliv celé nukleotidové sekvence vzájemně sdílejí relativně nízký stupeň identity, je získání celé délky této

sekvence komplikované. Počáteční CD80 produkt se získal z konstantní oblasti molekuly tj. plochy, která vykazuje nejvyšší stupeň konzervace v cDNA izolované z klonovaných druhů. Primery, které rozpoznaly tuto oblast a úspěšně amplifikovaly produkt, se připravily snadno a poskytly 344ntd. fragment zahrnující dobře konzervovanou IgC oblast. Bohužel měření, která byla potřebná pro izolaci sekvence těchto oblastí, byla díky nedostatku homologie v signálním peptidu a v cytoplazmatické doméně a 3' UTR mnohem komplikovanější. Nicméně přítomnost sekvencních dat středové oblasti poskytla pevný kotvicí bod, z něhož bylo možné odvodit zbytek molekuly. Kočičí CD80 je dobrým příkladem toho, jak lze získáním krátkého úseku molekuly a použitím RACE metod a degenerovaných primerů v kombinaci s kotvicími primery ze sekvencované oblasti snadno získat celodélkovou sekvenci.

Srovnání domnělých aminokyselinových sekvencí těchto klonovaných CD80 molekul ukazuje nedostatek celkové homologie. Myší a lidské polypeptidy vykazovaly nižší než 50% homologii na úrovni aminokyselin, což je srovnatelné s 59% identitou mezi kočičími a lidskými polypeptidy a 46% identitou mezi kočičími a myšími polypeptidy a pravděpodobně to odráží evoluční blízkost těchto druhů. Srovnání předpokládané hydrofilicity kočičích a lidských zbytků, které vykazují aminokyseliny, které by byly potenciálně exponované nebo vypuštěné z důvodu jejich relativní hydrofilicity, ukázalo, že přesto, že nemusí být specifické aminokyseliny, na úrovni aminokyselin, zachovány, že jsou změny relativně konzervované. To ukazuje potenciální retenci hydrofilně/hydrofobního charakteru molekuly, která tak může odrážet celkový strukturně podobný polypeptid. Zdá se, že povrchový protein má určité

aminokyseliny, které se můžou přímo podílet na navázání a další strukturní aminokyseliny, které si musí pouze zachovat strukturu umožňující interakci s vazebnou oblastí.

I navzdory určité divergenci v identitě aminokyselinových zbytků v CD80 molekulách izolovaných z primátů, hlodavců a kočičích zbytků zde existuje retence vlastností IgSF. Kočičí CD80 molekula je tvořena aminokoncovou IgC-pseudodoménou a IgV-pseudodoménou, která se nachází v blízkosti transmembránové oblasti. Pokud jde o konzervaci mezi myším a lidským CD80, je mezi konstantními oblastmi mnohem větší identita než mezi proměnnými oblastmi (Freeman a kol., 1989). Konzervace v proměnné oblasti přesahuje pouze 50 %, zatímco konzervace v konstantní oblasti přesahuje 70 %, přičemž krátké úseky od zbytku 164 až 198 (oblast, ze které byl získán počáteční fragment 344ntd.) mají mnohem větší identitu. Tato středová oblast 56 aminokyselin (zbytky 165 až 221) v konstantní oblasti vykazuje 87% homologii mezi lidskou a kočičí sekvencí, přičemž v rozsáhlé oblasti tvořené 28 aminokyselinami (zbytky 171 až 198) existuje pouze jediný rozdíl. Oblast v kočičím polypeptidu rovněž vykazuje významnou homologii s odpovídajícími zbytky v myším polypeptidu. Hydrofilní povaha aminokyselin v této oblasti ukazuje na vysokou pravděpodobnost povrchové exprese a vzhledem k úrovni konzervace křížových druhů na potenciální podíl při interakci ligand/receptor. Předpokládá se, že se IgC část molekuly přímo podílí na prezentaci vazebné domény pro interakci mezi receptorem a ligandem. (Peach a kol., 1995). Nicméně experimentálně se stanovilo, že pro účinné navázání je zapotřebí jak proměnný, tak konstantní motiv (Peach a kol., 1995). Koncentrace homologických zbytků v IgC oblasti extracelulárních domén společně s vysokou úrovní divergence

v transmembránové a cytoplazmatické doméně ještě dále potvrzují roli CD80 jako ligandu. Kočičí molekula CD80 je vysoce glykosilovaná. Nepředpokládá se, že by se uhlohydrátové zbytky přímo podílely na navázání, ale spíše se předpokládá, že by mohly pomáhat při zvyšování rozpustnosti extracelulární části molekuly (Peach a kol., 1995). Z 8 potenciálních míst, které se nacházejí v lidském peptidu, se 7 nachází v identických polohách kočičího proteinu. Místo na aminokyselinovém zbytku 39 v kočičí molekule se nereplikovalo do lidské CD80, ačkoli je zde místo na zbytku 232, které se zase nenachází v kočičím proteinu (Freedman a kol., 1987). V myší molekule se nachází 7 takových míst, ale pouze 2 v identických polohách, ačkoliv se zpravidla nacházejí ve stejných oblastech molekuly jako v případě kočičích a lidských peptidů (Freeman a kol., 1989). Zdá se, že podobnost v zachovaném počtu a polohách glykosilačních míst odráží důležitost motivů ve smyslu funkce molekuly.

Kočičí CD80 molekula má širokou škálu potenciálních použití. Tato molekula, jak byla diskutována v předchozí části, je důležitá pro správný vývoj odezvy zralé T-buňky. Monitorování exprese genu jak na úrovni RNA, tak na úrovni proteinů pomůže určit prostředek, pomocí kterého kočičí imunitní systém pracuje s infekcí. Znalost způsobu, kterým tento systém reaguje na specifický patogen, a jeho posouzení a porovnání s výsledky získanými při výzkumu dalších modelových systémů může vnést další světlo do pochopení lidské imunitní odezvy.

Důležitým budoucím použitím navrženým pro CD80 molekulu je zavedení nádorově specifické imunity do jiných druhů, které se realizuje zavedením CD80 genu do transformovaných buněk a následným zavedením zpět do

hostitele ve snaze poskytnout hostiteli imunitu vůči nádoru na bázi CTL (Townsend a Allison, 1993). Jak již bylo diskutováno, předpokládá se, že nádorové buňky budou na svém povrchu exprimovat CD80 jako specifickou CTL odezvu proti zhoubnému bujení (Hodge a kol., 1994). Kromě toho se v hostiteli vytvoří paměťová populace CD8⁺ T-buněk (Hodge a kol., 1994). I když se tato technologie zaměřila na nádorovou imunitu, lze její analogii aplikovat na vytvoření antivirové imunity.

Jak již bylo diskutováno výše, dlouhodobé neprogresivní období při AIDS je zprostředkováno počátečním vytvořením silné anti-HIV CTL odezvy (Landay a kol., 1994). Zdá se, že takové osoby, které jsou schopné po infekci setrvat v asymptomatickém stavu nejdéle, jsou schopny vytvořit a zachovat silnou CTL odezvu nasměrovanou proti viru.

Tradiční vakcíny byly směřovány k vytvoření humorální odezvy, pokud by však vakcína mohla indukovat vývoj anti-HIV/FIV mCTL populace, potom by tato populace mohla poskytnout podobnou ochranu jako v případě výše diskutovaných osob, u kterých nedochází dlouhodobě k vývoji AIDS. U panenských osob by mohlo mít zavedení vakcíny na bázi genu, ve které jsou FIV proteiny zkombinovány z CD80 peptidem, za následek povrchovou expresi kostimulační molekuly v kombinaci s MHC CI prezentací FIV epitopů. V případě úspěchu by toho mohlo vést k expanzi FIV specifické mCTL populace u panenské osoby. Po expozici virulentními viry by byla vakcinovaná osoba schopná vytvořit odezvu proti buňkám infikovaným virem a eliminovat tyto buňky dříve než bude mít virus příležitost propuknout a ničit složky imunitního systému.

Příklad 6

Klonování a sekvencování kočičí CD28 cDNA

Úvod

CD28 je povrchový glykoprotein, který se zpravidla exprimuje jako homodimer tvořený identickými disulfidy vážícími 44kDa podjednotkami. Je to člen imunoglobulinové supergenové rodiny a je charakteristický jednou extracelulární V oblastí, transmembránovou doménou a krátkým intracelulárním koncem (Aruffo a Seed, 1987). Přestože je tato molekula glykosilovaná, se nezdá, že by tyto zbytky hrály nějakou roli při navázání a předpokládá se, že jejich úkolem je zvyšovat rozpustnost extracelulární domény (Peach a kol., 1994). Byla klonována a sekvencována cDNA kódující lidské, krysí, myší a králičí peptidy a analogickou molekulu kuřat (Linsley a kol., 1995a).

CD28 se nachází na většině CD4⁺ a CD8⁺ thymocytech a periferních CD4⁺ a CD8⁺ T-buňkách se zvýšenou expresí způsobenou α ντ - XΔ3, PHA a PMA stimulací a se supresí způsobenou navázáním anti-CD28 (Linsley a kol., 1993b). Brzy po jeho objevení se zjistilo, že CD28 hraje důležitou roli při regulaci aktivace CD4⁺ a CD8⁺ T-buněk (June a kol., 1990). Kromě toho, že zesiluje aktivaci a proliferaci T-buněk, se dále ukázalo, že vyslání tohoto druhého signálu rovněž indukuje cytolytické aktivity v CTL (Azuma a kol., 1993c).

CD28 se exprimuje v raném stádiu zrání T-buněk. Zatímco nezralé CD3⁻ exprimují CD28 v koncentraci, která je vyšší než koncentrace exprimovaná CD4⁺ a CD8⁺ buňkami a vysokou koncentrací exprimovanou CD4⁺ nebo CD8⁺, CD3⁺ thymocyty (Turka a kol., 1991). Po dozrání se receptor

nachází na téměř všech $CD4^+$ T-buňkách a na více než polovině všech $CD8^+$ T-buněk v lidském těle (Turka a kol., 1991) a na téměř všech myších T-buňkách (June a kol., 1990). Tato molekula se neexprimuje na povrchu buněk v konstantní koncentraci (Turka a kol., 1990). Po aktivaci T-buňky se povrchová exprese zvýší, zatímco navázání molekuly na její ligand nebo specifickou mAb vede ke snížení koncentrace genu v aktivovaných buňkách jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinů (Linsley a kol., 1993a). Ačkoliv se CD28 nachází zejména na lymfocytech T-buněčné linie, byla tato molekula zaznamenána na plazmocytonech biopsií kostní dřeně (Kozber a kol., 1987) a exprimovány kulturami přirozené leukemické pseudokillerové buněčné linie (Azuma a kol., 1992).

CD28 sdílí určitý stupeň strukturní homologie s dalším B7 receptorem CTLA-4 a tyto dva receptory spadají do podrodiny existující v rámci IgSF skupiny (Linsley a kol., 1995a). Tyto dvě molekuly mají extracelulární IgV oblast, jedinou transmembránovou doménu a krátkou cytoplazmatickou signalizační doménu (Aruffo a kol., 1987). Přestože je celková homologie mezi těmito dvěma molekulami pouze přibližně 31%, existují v těchto dvou molekulách krátké oblasti a specifické zbytky, které jsou zcela konzervovány, což odráží potenciálně důležitou roli těchto motivů při rozpoznávání B7 a důležitost pro strukturní integritu (Leung a Linsley, 1994). MYPPPY motiv, tvořící oblast 6 zbytků, zůstal zachován ve všech izolovaných členech D28/CTLA-4 rodiny (Peach a kol., 1994). Tento motiv byl zmapován v pseudo-CD3 smyčkové oblasti v těchto molekulách a pokud je změněn mutací, potom dochází ke snížení ochoty CD28 a CTLA-4 navázat se (Peach a kol., 1994). Tato oblast byla navržena jako potenciální místo CD28 a CTLA-4 proteinu

pro navázání ligandu, ale doposud nebylo zjištěno, zda je tato oblast skutečným vazebným místem pro B7 nebo zda poskytuje strukturní motivy, které jsou nepřímo potřebné pro realizaci navázání (Peach a kol., 1994). Přestože CD28 a CTLA-4 sdílejí konzervované zbytky, váže se CTLA-4 na CD80 i CD86 s větší ochotou než CD28 (Ellis a kol., 1996). Takže, přestože se CTLA-4 exprimuje na T-buňkách koncentrací, která představuje pouze 2 až 3 % koncentrace CD28, je jeho ochota vázat se *in vitro* 20x vyšší (Linsley a kol., 1995b).

Ačkoliv jsou molekuly CTLA-4 a CD28 vývojově příbuzné a sdílejí společné ligandy, jejich funkční a signalizační schopnosti, jak se zdá, příbuzné nejsou (Balazano a kol., 1992). Porovnání signalizačních oblastí obou molekul neodráží vysokou identitu z čehož vyplývá, že signalizační dráhy iniciované jednotlivými molekulami jsou odlišné (Hutchcroft a Bierer, 1996).

Zatímco CD28 je exprimován v klidových T-buňkách a jeho koncentrace bezprostředně po aktivaci vzrůstá, má exprese CTLA-4 vrchol 48 hodin po aktivaci a do 96 hodin po aktivaci klesne na základní úroveň (Linsley a kol., 1992a). Zdá se, že exprese CTLA-4 koresponduje se snížením CD28 (Lindsten a kol., 1993). Navíc se zdá, že signalizační dráhy mediované navázáním ligandu na molekulu CD28 hrají důležitou roli při regulaci exprese CTLA-4 (Linsley a kol., 1993a). T-buňky, které jsou CD28⁻, neexprimují významnější množství CTLA-4 v odezvě na stimulaci PMA nebo kalciovým ionoforem (Lindsten a kol., 1993).

Úplný sled událostí signalizace mediované CD28 není zcela vysvětlen, nicméně byla vypracována určitá hypotetická kaskáda (Hutchcroft a Bierer, 1996).

Předpokládá se, že se na signalizaci podílí mobilizace intracelulárního Ca^+ , metabolismus fosfo-inositidu a indukce protein-tyrosinové fosforylace (Hutchcroft a Bierer, 1996).

Cytoplasmatický konec molekuly CD28 definoval motivy o kterých se předpokládá, že se podílejí na intracelulární signalizaci následující po navázání CD80 nebo CD86 (June a kol., 1994). Intra-cytoplasmatická 4laminokyselinová oblast, která nemá definovatelnou enzymatickou aktivitu neobsahuje intracelulární tyrosin aktivující motivy (jako například TCR) ani cysteinové zbytky pro navázání cytoplasmatické tyrosinkinasy Src rodiny (June a kol., 1994). Nicméně v izolovaných sekvencích se nachází několik konzervovaných potenciálních fosforylačních míst (Hutchcroft a Bierer, 1996). Intracelulární enzymatická aktivita a interakce protein-protein jsou často regulovány diferenciální proteinovou fosforylací, ačkoliv enzymy zodpovědné za tuto aktivitu CD28 nebyly doposud objasněny (Lu a kol., 1992). Konvenční místo YMXM, které se nachází v cytoplasmatickém konci, je navrženým místem pro navázání fosfatidylinositol-3 kinasy (PI3 kinasy) dependentní na Src homologní 2 fosfo-tyrosin-vázající doméně (SH2 doméně (Prasad a kol., 1995). Ačkoliv je toto jedna z potenciálních signalizačních drah CD28, ukázalo se, že PI3 kinasová aktivita nekoreluje s IL-2 aktivitou a protože zvýšení produkce IL-2, je primárním důsledkem signalizace CD28 a existuje domněnka, že se na aktivaci, která je výsledkem intracelulární signalizace, podílí i další dráhy (June a kol., 1994).

Ačkoliv není úloha těchto událostí zcela pochopená, je známo, že kostimulace CD28 vede ke zvýšení produkce cytokinů T-buňkami. V CD28^+ T-buňkách aktivovaných anti-CD3

nebo PHA zvyšuje anti-CD28 koncentraci RNA řady cytokinů ve stabilním stavu, přičemž mezi tyto citokiny lze zařadit IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, nádor nekrotizující faktor ($\text{TNF}\alpha$), lymfotoxin, $\text{IFN}\gamma$ a faktor stimulující granulocytové a monocytové kolonie (GM-CSF) a stejně tak receptor IL-2 (Lenschow a kol., 1996). Zvýšení mRNA ve stabilním stavu je důsledkem stabilizace transkriptů a současného zvýšení transkripce (Hutchcroft a Bierer, 1996).

Ačkoliv byly kostimulace CD28 prvně zdokumentována na CD4^+ T-buněčných klonech (Martin a kol., 1986) v současné době je již známo, že CD28 hraje i určitou roli při aktivaci mnoha buněčných typů. Ukázalo se, že kostimulace této dráhy redukuje produkci $\text{IFN}\gamma$, Th1 typu cytokinu, a produkci IL-4, Th2 typu cytokinu ve subpopulaci panenských CD4^+ T-buněk (Seder a kol., 1994). CD28 kostimulační dráha je rovněž důležitá při aktivaci CD8^+ CTL, ačkoliv se nezdá, že by byla nezbytná pro efektorovou fázi killingu mediovaného CTL (Hodge a kol., 1994). Zajímavé je, že jak se zdá, CD28 hraje určitou roli i v případě infekce HIV. V lymfocytech kultivovaných z osob pozitivních na tento virus může vést k navázání CD28 na monoklonální protilátku ke zvýšení produkce HIV (Asjo a kol., 1993).

Je jasné, že sekundární signál vyvolaný navázáním CD80 na CD28 má u primátů a hlodavců nepřehlédnutelnou roli při počáteční aktivaci T-buněk (Aruffo a Seed, 1987). Nicméně nedávné výzkumy ukázaly, že hlavním důsledkem této interakce může být dlouhodobá proliferace, k níž dochází v důsledku bránění nástupu apoptosy (Lenschow a kol., 1996). Klidové T-buňky v růstové fázi G_0 se mohou aktivovat vytvořením TCR komplexu, nicméně tyto buňky jsou za absence navázání CD28 neschopné proliferace nebo sekrece IL-2.

Tento stav se označuje jako klonální anergie (Linsley a kol., 1991a). Zralé T-buňky se zcela aktivují navázáním TCR na MHC na APC, ale to nakonec vede k aktivaci indukované buněčné smrti apoptosou (Radvanyi a kol., 1996). Přestože i další sekundární interakce (tj. ICAM-1 kostimulace) mohou poskytnout pomocné proliferační signály, zdá se, že CD28 mediované kostimulace je jedinečná při prevenci následného nástupu klonální anergie a apoptosy (Lidsley a kol., 1993a). Ukázalo se, že CD28 může hrát určitou úlohu při regulaci genů, o nichž je známo, že se významným způsobem podílejí na ochraně T-lymfocytů před apoptosou. (Boise a kol., 1995). V T-buňkách kostimulovaných navázáním CD28 bylo pozorované dlouhodobé zvýšení $bcl-x_+$ exprese (Boise a kol., 1995). Existuje zde domněnka, že CD28 kostimulace může stabilizovat $bcl-x_+$ mRNA, přičemž exprese kódovaného polypeptidu brání nástupu apoptosy (Radvanyi a kol., 1996).

Ukázalo se, že ligace CD28 hraje určitou roli při zvýšení produkce celé řady pomocných T-cytokinů typu 1 i cytokinů typu 2 (Lenschow a kol., 1996). Rovněž se zdá, že jim lze přiřadit určitou úlohu při vývoji specifických pomocných T-podsouborů. Panenské $CD4^+$ T-buňky budou zpravidla vyvíjet fenotyp Th1, pokud se budou aktivovat za nepřítomnosti signálu mediovaného navázání CD80 na CD28 (Lenschow a kol., 1996). To může být chápáno jako vedlejší role, protože produkce IL-4 může být indukována exogenním přidáním IL-2 a úloha signálu CD28 při produkci IL-2 již byla diskutována (Seder a kol., 1994).

Další studie zahrnující knockout CD28 u myši dále podporují tyto hypotézy týkající se úlohy receptorů při vývoji Th2 buněk.

Shahinian a jeho spolupracovníci vyvinuli myši $CD28^{-/-}$ ve snaze zjistit, jakým způsobem se zvíře přizpůsobí infekci za absence sekundárního signálu, který by vedl k expresi CD28 (Shahinian a kol., 1993). Gen v embryonálních kmenových buňkách se rozrušil částečnou náhradou sekundárního exonu neomycinově rezistentním genem (Shahinian a kol., 1993). Zjistilo se, že PBMC z myši homozygoty pro knockout neexprimuje na svých T-buňkách žádný CD28, zatímco u heterozygot $CD28^{-/+}$ se zjistilo, že mají sníženou expresi molekul na povrchu (Shahinian a kol., 1993). Mitogenní stimulace T-buněk odvozených z $CD28^{-/-}$ myši měla sníženou proliferaci T-buněk a produkci cytokinů, které mohly být pouze částečně uloženy exogenním IL-2 (Shahinian a kol., 1993). Ukázalo se, že vysoce purifikované T-buňky se za absence APC neaktivují lektiny (Unanue, 1984). Pokud jde o tento knockoutový kmen ukázalo se, že pro mitogenicitu T-buněčných lektinů je potřebná interakce CD28/CD80 (Shahinian a kol., 1993). Rovněž se ukázalo, že tato interakce je důležitá pro mediaci isotypických spuštění B-buňkami v odezvě na antigen. Na rozdíl od knockoutu CD80, lze prokazatelnou úlohu CD28 určit za použití technologie genového knockoutu. CTLA-4 knockoutová myš nebyla doposud zaznamenána, ale myš transgenní pro nadprodukcí CTLA-4 Ig již studována byla (Lane a kol., 1994). Jak lze předpokládat, tento kmen má určité fenotypické vlastnosti, které jsou podobné vlastnostem kmenů s deficiencí CD28 (Lane a kol., 1994). Přestože za normálních podmínek produkují izolované T-buňky normální množství IFN γ , dochází po stimulaci k výraznému snížení produkce IL-4 (Ronchese a kol., 1994). Toto vede k neschopnosti B-buněk vytvořit nebo zachovat Správnou humorální odezvu (Ronchese a kol., 1994). Přestože existuje celá řada drah navržených pro diferenciaci Th1 a Th2, má

interakce CD28/B7 nezanedbatelný vliv na diferenciaci T-buněčného podsouboru.

Interleukin-2 mRNA stabilizace může mít významnou funkci při navázání CD28, ale ukázalo se, že touto funkcí může být přímo nebo nepřímo ovlivněna i velká řada dalších cytokinů (Linsley a kol., 1991a). Zánětlivé mediátory IL-1 α , IL-6 a TNF α se produkují v paměťových T-buněčných populacích v odezvě na signál CD28, zatímco v panenských populacích se produkuje pouze IL-1 α (Cerdan a kol., 1991; van Kooten a kol., 1991). Exprese IL-4 je rovněž regulována signální dráhou CD28 (Seder a kol., 1994). Touto interakcí jsou rovněž zvyšovány exprese IL-5, IL-10 a IL-13, tj. dalších důležitých mediátorů humorální odezvy (deWaal Malefyt a kol., 1993; Minty a kol., 1993). Kromě kolonií stimulujícího a růstového faktoru včetně GM-CSF, CSF-1 a IL-3 a chemotaktických faktorů zahrnujících IL-8 jsou všechny zvyšovány signálem vysílaným CD28 (Harlan a kol., 1995).

Kromě již popsaného potenciálního použití CD80 při indukci imunity proti rakovině byla navržena i další klinická použití CD28 a CD80. Prevence interakce mezi CD28 a CD80 ukázala na modelových systémech hlodavců, že lze léčit některé autoimunitní odezvy, že lze zabránit odhojení orgánu nebo nástupu chorob „štěp versus hostitel“ a sepsi spojené s uvolňováním cytokinů (Harlan a kol., 1995; Nickoloff a kol., 1993; Thomas a kol., 1994; Zhou a kol., 1994). Přidáním CTLA-4 Ig do blokové CD28/CD80 interakce u myši lze zabránit příznakům podobným sžíravým vředům u NZB/NZW myši a krysy lze částečně chránit před smrtelnou EAE a smrtelnou nefritidou (Harlan a kol., 1995). Přesto, že imunoterapeutické pokusy zaměřené proti autoimunitním

chorobám u lidí nebyly doposud prováděny, ukázalo se, že biopsie odebrané osobám trpícím lupenkou a revmatickou artritidou vykazovaly expresi CD80, zatímco normální biopsie tuto expresi nevykazovaly (Nickoloff a kol., 1993; Thomas a kol., 1994). U transplantátů kostní dřeně a orgánových transplantátů u myši a v případě *in vitro* humánních experimentů vedlo přidání CTLA-4 Ig a bránění interakci CD28/B7 k alespoň částečné ochraně před odhojením orgánu, k ochraně před GVLD nebo před indukci antigenově specifické tolerance (Harlan a kol., 1995). Na závěr lze konstatovat, že *in vivo* podání CTLA-4 Ig může u myši zabránit uvolnění cytokinu a vypuknutí sepse, která může vést k septickému šoku nebo k otravě krve (Zhou a kol., 1994). Manipulace s interakcí CD28/CD80 umožňuje lépe pochopit T-buněčnou kostimulaci a umožňuje řešit celou řadu problému s touto kostimulací spojených.

Materiály a metody

Izolace počátečního fragmentu CD28

mRNA se extrahovala z HK5 lymfocytů periferní krve stimulovaných 16 hodin ConA za použití RNazolB RNA extrakčního činidla (Biotexc, Houston, TX). Nejprve se z této RNA reakcí reverzní transkriptasy (RT) využívající jako 3'primer oligo dT primer odvodila cDNA. RNA a oligo dT se 3 minuty zahřivaly na 75 °C s cílem odstranit sekundární strukturu. Potom se přidaly RT, dNTP, pufr a destilovaná voda a směs se 1 hodinu inkubovala při 42 °C. Po této inkubaci se vzorek ohřál na 95 °C a při této teplotě udržoval 5 minut ve snaze inaktivovat RT. Degenerační primery odvozené z konvenčních oblastí, které se nacházejí

v humánních, myších a králičích CD28 publikovaných sekvencích nukleových kyselin (GeneBank, Bethesda, MD) se potom použily při počáteční amplifikaci 673 ntd fragmentu kódujícího většinu otevřeného čtecího rámce.

CD28-113: CAA CCT TAG CTG CAA GTA CAC

CD28-768: GGC TTC TGG ATA GGG ATA GG

Pro amplifikaci produktu se použil PCR protokol s horkým startem, který používá Taq polymerasu (95 °C 5 min 1 cyklus; 95 °C 30 s, 48 °C 30 s a 72 °C 45 s, 30 cyklů; 72 °C 7 min 1 cyklus). Tento fragment se následně vizualizoval na 1% agarosovém gelu, ligoval do TA chlorovacího vektoru (InVitrogen, San Diego, CA) a sekvencoval již popsáním způsobem. Ze sekvence cDNA se odvodily specifické 3'primery a syntetizovaly pro použití při 5'RACE reakcích.

CD28-190: CGG AGG TAG AAT TGC ACT GTC C

CD28-239: ATT TTG CAG AAG TAA ATA TCC

Izolace 5'oblasti CD28

Pro získání zbývající 5'sekvence kočičí CD28 molekuly se použil modifikovaný GIBCO 5'RACE protokol (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). RNA se extrahovala z PBMC stimulované 16 hodin Con A. Pro syntézu 1. řetězce cDNA se použil 3'genově specifický primer. RNA a primer se před přidáním dalších RT reakčních činidel ohřívaly 5 minut na 75 °C. Po denuraci se směs ochladila na 4 °C a přidal se pufr, chlorid hořečnatý, dNTP, DTT a SuperScript RT (Gibco BRL,

Gaithersburg, MD). RT směs se inkubovala 30 minut při 42 °C, načež se zahřála na 70 °C a při této teplotě udržovala 15 minut ve snaze denaturovat RT. Potom se přidal RNAsový koktejl a reakční směs se 10 minut inkubovala při 55 °C, čímž se odstranila RNA residua a zabránilo se extenzi nesprávné koncové transferasy (TdT). cDNA se následně purifikovala přes kolonu GlassMax Spin (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) s cílem odstranit nezabudovanou dNTP a primer. Purifikovaná cDNA eluovaná z kolony se následně spojila s TdT. TdT se použila pro zavedení dC paty obsahující 20 až 30 nukleotidů do cDNA. Do směsi purifikované cDNA, chloridu hořečnatého, reakčního pufru a dCTP se po denuraci cDNA 3 minuty při 95 °C přidal enzym. Reakční směs se 10 minut inkubovala při 37 °C, načež se enzym inaktivoval 10minutovým ohřevem na 70 °C. Patou ukončená cDNA se amplifikovala PCR reakcí s horkým startem na bázi Taq polymerasy (95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s 35 cyklů; 72 °C 7 min). Primery pro tuto reakci zahrnovaly 3'primer nacházející se na 5'konci primeru cDNA syntézy a kotvicí primer specifický pro dC linker tvořený převážně dG s několika dI residui. 1 Mikrolitr této reakční směsi se naředil 50 mikrolitry vody a 5 mikrolitrů tohoto naředěného roztoku se následně použilo při „nested“ PCR reakci (95 °C 5 min 1 cyklus; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s a 72 °C 45 s 30 cyklů při použití KlenTaq polymerasové směsi) s dG/dI 5'kotvicím primerem a dalším upstream genově specifickým 3'primerem. 30 Mikrolitrů „Nested“ reakce se následně vizualizovalo na 1,5% agarosovém gelu a správný fragment se z gelu extrahoval (obr. 19). cDNA se purifikovala již popsáním způsobem pomocí gelového nebulizeru Amicon a filtru Micropure (Amicon, Beverly, MA). Purifikovaný vzorek cDNA se cyklicky sekvencoval pomocí barviva jako terminátoru

(Perkin Elmer, Norwalk, CN). Z ukončených fragmentů se odvodila konvenční sekvence. Z této sekvence se syntetizoval primerový pár, který zahrnoval celý otevřený čtecí rámec kočičího CD28 genu:

feCD28 5': CGC GGA TCC ACC GGT AGC ACA ATG ATC CTC AGG

feCD28 3': CGC GGA TCC TCT GGA TAG GGG TCC ATG TCA G

Za použití těchto primerů se z Con A stimulovaných EK6 a ED3 PBMC odvozené cDNA amplifikovala cDNA molekula obsahující celou kódující oblast. Na takto připravené PBMC cDNA se demonstrovalo, že obsahuje RNA kódující gen. Tato PCR reakce (95 °C 5 min 1 cyklus; 95 °C 30 s, 42 °C 30 s a 72 °C 45 s 30 cyklů; 72 °C 7 min) používající KlenTaq DNA polymerasu ve snaze redukovat náhodné chyby spojované s Taq polymerasou produkovala 754 bp fragment, který se naklonoval do TA klonovacího vektoru a sekvencoval již popsaným způsobem. Stejně jako v případě CD80 molekuly bylo každé nukleotidové místo ověřeno alespoň 3 nezávisle odvozenými sekvencemi.

Výsledky

Při PCR reakci, která s úspěchem poskytla produkt obsahující téměř celou kočičí sekvenci, se požíly degenerované primery zvolené z konvenčních oblastí myší, lidské a králičí CD28 cDNA sekvenci. Díky vyššímu stupni konzervace v molekule CD28 poskytla počáteční amplifikace prováděná za použití degenerovaných primerů v podstatě celou molekulu. Jako protiklad ke kočičí CD80, u které se na počátku vyprodukoval pouze malý středový fragment, v

otevřeném čtecím rámci CD28 cDNA scházel pouze nejkrajnější 5'konec tvořený 113 ntd (obr.20). Tento počáteční sekvenční fragment sdílí 86% homologii s analogickou oblastí lidské sekvence a 86% identitu s analogickou oblastí králičí cDNA a 79% homologii s myší kódovací sekvencí.

5'ATG a dalších 110 ntd a rovněž určitá upstream 5'sekvence se izolovala za použití 5'RACE PCR (Gibco, Gaithersburg, MA). Při koncových reakcích se použila cDNA přepsaná z EK6 Con A stimulované PBMC. U tohoto materiálu produkovala amplifikace s primerem CD28-786 a kotvícím primerem Dg špatně definovatelný materiál (obr.21). Ačkoliv se při kombinaci primerů dG-786 neamplifikovaly žádné identifikovatelné pásy, při použití „nested“ CD28 primerů CD28-182 a CD28-239 se z této reakce amplifikovala nařaděná cDNA. Byla patrná přítomnost viditelného pásu přibližně na 600 bp. Tento produkt, pokud se izoloval z agarosového gelu a sekvencoval, obsahoval 5'upstream sekvenci zahrnující výchozí kodon a navazující na tento kodon (obr. 22).

Ze sekvence těchto produktů se odvodil 5'primer, který obsahoval výchozí kodon. Tento primer se v kombinaci s 3'konstruktem použil pro amplifikaci cDNA z RNA extrahované z EK6 a ED3 Con A stimulované PBMC produkující 754bp produkt (obr.23).

Z každého zvířete se kompletně sekvencovaly alespoň 2 takové produkty, u nichž se každé místo nukleotidové kyseliny zkontrolovalo a potvrdilo alespoň 3 nezávislými správnými čtecími sekvencemi. Po sekvencování celé délky se produkt sekvencoval z TA klonovacího vektoru ve snaze zajistit konzistentní a reprodukovatelný produkt.

Ve finálním 685bp fragmentu kódujícím celý otevřený čtecí rámec se 5'ATG nacházel v poloze 1 a koncový kodon se nacházel v poloze 664 až 666 s dalšími 19 nukleotidy ve 3'UTR (obr. 24). Stejně jako v případě kočičí molekuly CD80 se 5'poloha ATG kodonu potvrdila sekvencováním 5'RACE PCR produktů (data nejsou uvedena).

Kočičí CD28 gen po sekvencování vykazoval celkovou identitu, která byla nejbližší králičí a lidské sekvenci (obr. 25). Homologie s myší cDNA byla ještě stále poměrně silná, ale identita s kuřecí sekvencí byla divergentnější, nicméně srovnatelná s homologií pozorovanou mezi kuřecí sekvencí a geny ostatních savců (tabulka 2).

Tabulka 2: Porovnání sekvenční homologie kočičí CD28 s myší, lidskou, kuřecí a králičí CD28

Druh	Procento homologie s kočičí sekvencí:	
	Aminokyselina	Nukleotid
Člověk	85%	82%
Myš	77%	74%
Králík	84%	84%
Kuře	59%	50%

Již popsaným způsobem se z nukleokyselinové sekvence odvodila aminokyselinová peptidová sekvence. Identita s odvozenými peptidovými sekvencemi dalších publikovaných genů byla srovnatelná s identitou na nukleotidové úrovni. Signální sekvence peptidu sahá do 5'methioninu až po zbytek 19. Zdá se, že v kočičí molekule, stejně jako v dalších klonovaných CD28 polypeptidech, sahá signální

extracelulární IgSF proměnná pseudodoména od zbytku 19 po zbytek 153. Hydrofobní transmembránová doména pokrývá následujících 27 zbytků a za ní následuje 41 aminokyselinový cytoplazmatický konec. Stejně jako u lidské molekuly CD28 má kočičí polypeptid 5 potenciálních N-vážíčích glykosilačních míst (obr. 26).

Srovnání předpokládané aminokyselinové sekvence kočičího a lidského proteinu CD28 demonstrovalo oblasti homologie s určitými rozdíly (obr. 27). Většinu změn lze nalézt v transmembránové doméně, v signální sekvenci a v HN_3 koncové doméně. Nejvyšší stupeň homologie lze nalézt ve středové IgSF V pseudodoméně a v cytoplazmatickém konci.

Porovnání kočičí molekuly CD28 s předpokládanými aminokyselinovými sekvencemi lidských a myších členů CD28/CTLA-4 rodiny demonstruje, že mezi členy této skupiny existuje pouze 25% celková homologie, nicméně zůstaly zde zachovány určité specifické oblasti a zbytky. MYPPPY motiv zůstal zachován u všech členů této skupiny. Zdá se, že v kočičí molekule zůstaly zachovány i další zbytky o nichž se předpokládá, že jsou důležité pro strukturní integritu a mezi které lze zahrnout určitý počet konzervovaných cysteinových zbytků (obr. 28).

Cytoplazmatická doména kočičí molekuly CD28 je středně konzervovaná s dalšími publikovanými sekvencemi, zejména savčími sekvencemi (obr. 29). Jako důsledek síťování extracelulární části receptoru byly navržena celá řada intracelulárních signalizačních drah (Hutchcroft a Bierer, 1995).

Porovnání grafů hydrofilicity předpokládané aminokyselinové sekvence kočičí molekuly CD28 s podobnými

grafy navrženými pro lidský polypeptid dále demonstruje pravděpodobnost toho, že si každý protein zachovává podobnou strukturní integritu. Nezdá se, že by případné změny v aminokyselinové sekvenci způsobovaly významné změny v hydrofilicitě molekuly, z čehož vyplývá, že změny v aminokyselinové sekvenci lze považovat za značné homologické. Za zmínku stojí hydrofilní transmembránová doména, ve které kočičí a lidské peptidy sdílejí pouze 75% homologii a která má přesto ještě podobný profil hydrofilicity (obr. 30).

Diskuse

Všechny sekvence klonovaných molekul CD28 vykazují střední úroveň vývojové konzervace. Lze se domnívat, že úloha molekuly při aktivaci a mediování imunity zprostředkované T-buňkami je zachována u celé řady vyšších obratlovců počínaje ptáky přes hlodavce a masožravce a včetně vyšších primátů.

Srovnání domnělých aminokyselinových sekvencí každé z molekul vykazuje mírnou homologii v částech extracelulární domény, o nichž se předpokládá, že se podílí na navázání ligandu, a v intracelulárních oblastech, o nichž se předpokládá, že podporují intracelulární signalizaci. Souhrnem lze říci, že nejvyšší stupeň homologie se nachází v oblasti obklopující navržené místo pro navázání ligandu MYPPPY, které se nachází v IgV doméně a leží v rozsahu zbytků 118-123 kočičího polypeptidu.

Navržená signální sekvence polypeptidů sahá od 5'methioninu až po zbytek 19 (Aruffo a kol., 1987). Monomerní CD28 je tvořena signální extracelulární IgSF

proměnnou pseudodoménou, která probíhá od zbytku 19 po zbytek 153 (Aruffo a kol., 1987). Hydrofobní transmembránová doména leží na následujících 27 zbytcích a za ní následují 41aminokylelinový cytoplazmatický konec (Aruffo a kol., 1987). Kočičí protein má 5 potenciálních N-vážíčích glykosilačních míst v identických pozicích jako lidský protein. Je zajímavé, že glykosilační místo, které se nachází na zbytku 105 kočičího proteinu, je NQS, zatímco v lidské sekvenci je to NQT. Tato aminokyselinová divergence dále odráží to, že zatímco mezi molekulami existují sekvenční změny, zůstávají celkové strukturní vlastnosti zachovány.

Jak by bylo možné očekávat na základě úrovně homologie sdílené tímto proteinem, ukazuje srovnání grafu hydrofilicity kočičí a lidské molekuly CD28, že tyto molekuly potenciálně sdílejí podobné konformační vzory. Nicméně rovněž se ukázalo, že pokud zde existuje změněný zbytek, potom je tato změna zpravidla homologická. Zatímco transmembránová doména představuje oblast molekuly s nejnižším stupněm konzervace, jejíž prosté zachování vyžadovalo hydrofobní charakter, je cytoplazmatická doména molekuly CD28, v porovnání s ostatními publikovanými sekvencemi, konzervována pouze mírně. Předpokládá se, že navázání extracelulární části receptoru zprostředkovává celou řadu intracelulárních signalizačních drah a ačkoliv intracelulární část polypeptidu CD28 nemá vlastní enzymatickou aktivitu, ale spíše schopnost vázat ligand, způsobuje aktivaci intracelulárních efektorových molekul (Aruffo a kol., 1987). Jako potenciální místa pro fosforylaci tyrosinu byly navrženy 4 konzervované tyrosinové zbytky (Y¹⁷³, Y¹⁸⁸, Y¹⁰¹ a Y²⁰⁰) (Lu a kol., 1992). Jako místo SH2 domény v lidském a myším proteinu byla dále

navržena MNM sekvence, která má počátek na zbytku 193 kočičí molekuly (Prasad a kol., 1995). Potenciální místo fosforylace proteinkinasolu C zůstalo na S¹⁸⁵, zatímco T²⁰² by mohlo být místem Erk1 nebo Erk2 prolinem řízené serin/threoninkinasové aktivity (Hutchcroft a Bierer, 1996). Jak již bylo diskutováno výše, signální funkce receptoru CD28 má více aspektů, takže není překvapením, že cytoplazmatický konec peptidu má množinu potenciálních signalizačních mediátorů.

Další aplikace kočičí molekuly CD28 by mohly zahrnovat vývoj nástrojů pro detekci povrchové exprese receptoru a monitorování exprese CD28 po infikaci viry, například po infikaci FIV. Pokud by se nástroje pro detekci proteinu mohly zkombinovat s již existujícími metodami měřené detekce, potom by bylo možné získat hodnotné informace o úrovni exprese v průběhu infekce. Další korelace CD28 expresních vzorů v průběhu chronické FIV infekce by umožnila použít kočičí systém jako příklad správného modelu HIV infekce u lidí a mohla by vést k získání úplnějších odpovědí na stále ještě nezodpovězené otázky související z průběhem infekce u obou systémů.

Příklad 7

Expese proteinu CD28/CD80

Úvod

Přestože komunikace v imunitním systému je z velké části zprostředkována rozpustnými faktory, pro přímý kontakt buňka-buňka je u primátů a hlodavců potřebná

iniciace primární T-buněčné odezvy (Mescher, 1992). Na počátku byla domněnka, že se tato interakce podílí pouze na interakci mezi TCR na T-buňce MHC na antigen prezentující buňce, ale později se zjistilo, že navázání mezi akcesorními molekulami je potřebné pro úplnou aktivaci T-buňky (Schwartz, 1992). Jak již bylo diskutováno, důkazem toho je interakce mezi CD28 a CD80 vedoucí k vyvolání tohoto akcesorního signálu (Linsley a kol., 1991a).

Mnoho důležitých receptorů a ligandů u obratlovců spadá do superrodiny IgSF (Springer, 1990). Tyto molekuly jsou charakteristické přítomností imunoglobulinové pseudo-oblasti, která se nachází zpravidla v extracelulární části molekuly (Buck, 1992). Ačkoliv stupeň konverzace je různý, omezuje se často na ty zbytky, které jsou potřebné pro generování Ig sbalení (Beale, 1985). Charakteristiky Ig domény zahrnují 2 blízce související anti-paraletní β -řetězce spojené smyčkami, za nimiž následuje konzervovaná topologie (Williams a Barclay, 1988). I přes sdílení strukturních vlastností jednotlivými členy této rodiny je pro tuto rodinu příznačné diverzní uspořádání vazebných interakcí a signalizačních vlastností (Anderson a kol., 1988).

Jako členové IgSF rodiny sdílí jak CD28, tak CD80 určitý stupeň strukturní podobnosti ve svých extracelulárních doménách. CD28 má jedinou extracelulární V oblast, ačkoliv je exprimován jako heterodimer navázaný na disulfid (Aruffo a kol., 1987). Extracelulární oblast CD80 molekuly má však jak V typ, tak C typ domény a je exprimována jako monomer (Freedman a kol., 1989). Vzhledem k tomu, že členové IgSF rodiny sdílejí strukturní znaky lze, pro vytvoření ideální přirozené struktury příbuzných molekul, které by nebyly krystalizované, použít pouze omezené

teploty (Bajorath a kol., 1993). Ačkoliv CD28 ani CD80 polypeptid není krystalizován, byly molekuly CD28 (Driscoll a kol., 1991) a CD8 (Leahy a kol., 1992) s analogickými extracelulárními doménami analyzovány pomocí rentgenové krystalografie a poskytly určitou představu o struktuře příbuzných členů IgSF rodiny (Linsley a kol., 1995a).

Jak již bylo diskutováno CD80 a CD86 sdílí podobnou ochotu se vázat s molekulami CD28 a CTLA-4. Nicméně CD28 je nízkoafinitním receptorem pro tyto ligandy, zatímco CTLA-4 má vysokou afinitu pro objem molekuly (Linsley a kol., 1994a). Přestože byl navržen určitý možný mechanismus, není doposud jasné, jak je nízkoafinitní receptor s vysokou rychlostí disociace, jako například CD28, schopen vysílat nezbytný kostimulační signál pro vývoj T-buněk (Linsley a kol., 1995a). Předpokládá se, že navázání CD80 na CD28 na povrchu T-buňky může podporovat oligerimizaci receptoru, který by mohl usnadnit produktivní navázání a vyvolání signálu (Linsley a kol., 1995a). Bylo zjištěno, že CD28 je pravidelně distribuován na aktivovaných T-buňkách a tak se tedy předpokládá, že po zachycení T-buňky tato molekula migruje na membránu (Damle a kol., 1994). Vysoká koncentrace oligerimizovaného CD28 by podporovala reasociaci volného CD28 v oblasti kontaktu buňka-buňka a podporovala by vyslání signálu bez ohledu na vysokou rychlost disociace (Linsley a kol., 1995a). Tento způsob, který je označován jako přímý „capping“, nebyl sice přímo pozorován v souvislosti s interakcí CD28/CD80, ale byl pozorován v případě dalších receptorů, kde byla potřebná podobná interakce pro kontakt buňka-buňka (Singer, 1992).

I když se ukázalo, že pro promologaci T-buňkami zprostředkované imunitní odezvy je důležitá interakce mezi molekulami CD28 a CD80 existuje ještě stále velká oblast

mechanismu této signální dráhy, která nebyla objasněna (Linsley a kol., 1993a). Existence 2 receptorů a 2 ligandů vyvolává otázku, jakou úlohu každá z těchto molekul sehrává při aktivaci T-buněk (Linsley a kol., 1992b). CTLA-4 se sice váže silněji, ale exprimuje se mnohem později po aktivaci a ačkoliv byly pro CD28 navrženy signalizační dráhy, nebylo doposud určeno, zda po navázání ligandu na CTLA-4 dojde k vyslání signálu (Linsley a kol., 1995a).

Materiály a metody

Příprava inzertů

Pro amplifikaci celého otevřeného čtecího rámce genů pro kočičí CD28 a CD80 pro zavedení do exprimačních vektorů se použily následující primery

fe CD80 5': CGC GGA TCC GCA CCA TGG GTC ACG CAG CAA AGT GGA
AAA C

feCD80-960: CCT AGT AGA GAA GAG CTA AAG AGG C

feCD28 5': CGC GGA TCC ACC GGT AGC ACA ATG ATC CTC AGG

feCD28 3': CGC GGA TCC TCT GGA TAG GGG TCC ATG TCA G

Aby se usnadnilo zavedení do množiny klonovacích míst, opatřily se 5'CD80 primer a oba CD28 primery s *Bam*HI místy a vhodnými linkery. 3'*Bam*HI místo se přeneslo na CD80 sekvenci vydigerováním TA klonovacího vektoru. 5'primery rovněž obsahují Kozakův box a 5'ATG pro oba geny. V obou případech se primery použily pro amplifikaci z templátu kódujícího celou sekvenci každého genu, který byl předem naklonován do TA klonovacího vektoru. Přibližně 10 ng každého plasmidu se použilo při PCR amplifikaci prováděné

na bázi Taq polymerasy (95 °C 5 min, 1 cyklus; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 68 °C 45 s, 30 cyklů; 68 °C 7 min 1 cyklus). Amplifikované produkty se vizualizovaly elektroforézou na agarosovém gelu a potom ligovaly již popsaným způsobem do TA klonovacího vektoru (Invitrogen, San Diego, CA). Ligační reakce se použila pro transformaci *InvαF'* kompetentních buněk a pozitivní klony se screenovaly a vybraly již popsaným způsobem.

Klonování do pSI

V rámci klonování do pSI se při transformaci COS-7 buněk použil vektor, plasmid se digeroval *EcoRI* a enzym se následně odstranil odstředivou kolonou Micropure EZ (Amicon, Beverly, MA). Po odstranění enzymu se plasmid zpracoval fenolem a chloroformem ve snaze odstranit veškerý residuální protein a alkohol se vysrážel. Inzerty se digerovaly z 50 µg plasmidové DNA purifikované QIAGENEM (Qiagen, Chatsworth, CA). Z klonů obsahujících TA klonovací vektor se správnými inzerty za použití *EcoRI* míst nacházejících se ve vektoru lemujícím inzert. 100 µl Digestu se zpracovalo pomocí elektroforézy na 1,5% agarosovém gelu a digerovaný fragment se vystříhнул. Inzert se následně purifikoval z agarosy pomocí gelového nebulizeru a filtrační jednotky Microcon (Amicon, Beverly, MA). Ošetření pSI digerovaného pomocí *EcoRI* se zpracovalo alkalfosfatásou, čímž se redukovaly změny autoligace vektoru. Jedn hodinové zpracování 0,1 U/µg telecí intestinální alkylinfosfatázy (CIP) prováděné při 37 °C defosforylovalo digerované konce vektoru. CIP se odstranila tepelnou denaturací prováděnou 30 min při 65 °C a potom následovala purifikace odstředováním v odstředovací koloně

Micropure EZ (Amicon, Beverly, MA). Inzerty se ligovaly přímo do řezu a defosforylovaného pSI vektoru přes noc při teplotě 16 °C a za použití T4 DNA ligasy. Molární poměr ligandu ku vektoru byl přibližně 3:1 při 0,05 µg CD28 nebo CD80 inzertu ku 0,1 µg pSI. Jeden µl ligační reakce se následně použil pro transformaci *InvαF'* kompetentních buněk. Buňky se nanesly v proužcích na LB plotny obsahující 50 µg/ml ampicilinu. Plotny se inkubovaly přes noc při 37 °C a následující den se kolonie naočkovaly do 5 ml LB média obsahujícího 100 µg/ml ampicilinu. Po celonoční inkubaci při 37 °C za současného protřepávání při frekvenci 220 min⁻¹ se plasmidová DNA extrahovala alkalickou lyzí, DNA se purifikovala fenol/chloroformovou extrakcí a vysrážela dvěma objemy 95% ethanolu. Na DNA se působilo RNasou a produkt se následně digeroval 10 jednotkami *EcoRI*. Digesty se vizualizovaly na 1% agarosovém gelu ve snaze identifikovat pozitivní klony. Plasmidová DNA se následně extrahovala z 5 ml noční kultury pozitivních klonů za použití QIAprep odstředivých kolon (QIAGEN, Chatsworth, Ca) (Obr. 31). Purifikovaná DNA se následně sekvencovala za použití terminačního cyklu na bázi barviva s vnitřním 3'primerem s cílem stanovit orientaci inzertu v plasmidu. Lokalizace primeru byla taková, že sekvencování mohlo probíhat přes spoj mezi vektorem a inzertem, čímž se zajistila správná orientace. Klon každého genu s tímto plasmidem ve správné orientaci se potom nechal růst ve 100 ml kultury a plasmid se extrahoval pomocí QIAGEN (Chatsworth, CA) maxi-prep kolony.

Klonování do SFV

Při zavádění do SFV vektoru se inzerty a plasmid zpracovali v podstatě stejným způsobem. 100 µg SFV vektoru se 1 hodinu digerovalo při 37 °C 120 jednotkami *Bam*HI (obr. 32). Enzym se z digestu izoloval odstředováním pomocí Micropure EZ filtru (Amicon, Beverly, MA). Plasmid se následně ošetřil pomocí CIP. CIP se tepelně inaktivovala a plasmid se potom opět purifikoval Micropure EZ filtrem. Inzerty se z purifikované TA klonující vektorovou DNA purifikovaly digerací pomocí *Bam*HI. Inzerty se purifikovaly a již popsaným způsobem ligovaly do vektoru. Po transformaci *InvαF'* kompetentních buněk se plasmidový inzert a orientace potvrdily již popsaným sekvencováním pomocí barvivového terminačního cyklu. Příprava plasmidu se ve velkém měřítku prováděla na pozitivním klonu každého genu.

Exprese pSI proteinu

Při pSI transformaci eukariotických buněk se COS-7 buňky získaly od American type culture collection (ATCC). Zmražená zásobní surovina se resuspendovala v 15 ml DMEM + 10% fetálním telecím séru (FCS). Kultury se nechaly následně růst jako monovrstva v baňkách T-75. Večer před transfekcí se buňky po ošetření 0,25% roztokem trypsin EDTA z baňek odstranily propláchnutím PPS. Buňky se následně inokulovaly přibližně 20% splývavosti do 100 mm kultivačních misek a následující den nechaly dorůst do přibližně 50% splývavosti. V případě každé transfektované misky se 5 ml DMEM-NuSera (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) smísilo s 0,2 ml DEAE-dextran/chlorochinového roztoku.

Do této směsi se potom přidalo 10 µg/ml purifikovaného pSI plasmidu. Z COS buněk se odsála média a přidal se DMEM-NuSerum/DEAE-dextran/chlorochin/DNA roztok. Kultura se inkubovala 3,5 h v inkubátoru obsahujícím 5% CO₂. Potom se odstranilo médium a nahradilo 5 ml 10% DMSO v PBS. Po 2 min se tento roztok odsál a buňky se nechaly růst přes noc v 5 ml DMEM/10% FBS. Následující den se buňky rozdělily do dvou 100 mm kultivačních misek. Po 3 dnech se média odsála a transformované buňky se odstranily z PBS/0,5 µM EDTA. K buňkám se přidala směs PBS a EDTA a buňky se 15 min inkubovaly při 37 °C. Supernatant se odstranil a sloučil s následnými PBS průplachy. Supernatant a průplachy se potom odstřeďovaly. Výsledné pelety se resuspendovaly v DMEM/FBS a COS buňky se sečetly.

Expresa proteinu SFV

Transfekce SFV vektorem se prováděla v buňkách ledvin mláděte křečka (BHK). 30 µg purifikovaného plasmidu se 1 h digerovalo při 37 °C SpeI. Enzym se následně odstranil Micropure EZ filtrem (Amicon, Beverly, MA) a DNA se vysrážela 2,5 objemy 95% roztoku EtOH. 1,5 µg plasmidu se potom použilo jako templát pro *in vitro* transkripci mediovanou Sp6. DNA se 1 h inkubovala při 37 °C s: transkripčním pufrem, 100 mM DTT, 100 mM G(5')ppp(5')G, směsí rNTP, vodou, RNasinem, a 60 jednotkami Sp6 RNA polymerasy. Po transkripci se reakční směs rozdělila na alikvotní podíly a vzorek se vizualizoval na 1% agarosovém gelu. 45 µl Transkripční reakční směsi se použilo pro transfektování BHK buněk při přibližně 80% splývavosti v baňkách T-75. GMEM médium + 10% FCS médium se z buněk odsály a nahradily médiem Opti-MEM. Po 2minutové inkubaci

se toto médium nahradilo Opti-MEM médiem/9 µh/ml lipofectinu/přepsanou RNA. Kultury se 2 h inkubovaly při 37 °C v 5% CO₂ za častého manuálního míchání. Po 2 h se médium odstranilo a nahradilo GMEM-10% FCS. Kultury se inkubovaly 7 až 9 h a buňky se následně odstranil trypsinizací.

Klonování do pQE

Pro kočičí CD 80 a CD28 gen se rovněž zkonstruoval bakteriální expresní vektor pQE. Vyřízlý a CIP ošetřený pQE plasmid, připravený a purifikovaný již popsáním způsobem se ligoval T4 DNA ligasou v molárním poměru inzerť ku plasmidu 4:1 za použití 50 ng gelem purifikovaného CD28 nebo CD80. Ligace se inkubovala 16 h při 16 °C. 2 µl Ligační reakce se následně použily pro transformaci *INVαF'* kompetentních buněk. Pozitivní kolonie se vybraly a orientace inzertu se potvrdila sekvencováním. Provedla se příprava purifikovaného plasmidu ve velkém měřítku a plasmid se použil pro transformaci M15 pREP4 buněk připravených pomocí rubidiumchloridu. Transformované buňky se nechaly vyrůst na LB plotnách obsahujících 50 µg/ml kanamycinu a ampicilinu, jejichž úkolem bylo zajistit zadržení pQE a pomocných pREP4 plasmidů v těchto koloniích. Pozitivní kolonie se následně screenovaly alkalickou vizí minipreparátu a *Bam*HI restriční digerací. Kolonie s potvrzenými inzerty se zmrazily pro budoucí použití v 50% glycerolovém zásobním roztoku.

Vazebný test

Vazebné testy pro transfektované buňky exprimující kočičí CD80 a CD28 se prováděly podle protokolu, který popsal Linsley a kol., 1994a. Jeden den po transfekci se CD28 exprimující COS-7 buňky odstranily pomocí trypsin-EDTA z buněk T-75. Buňky se nechaly přilnout k jamkám 24jamkových ploten v koncentraci 1×10^5 buněk/ml. O 2 dny později se feCD80/pSI transfektované COS-7 buňky odstranily pomocí PBS/0,5 μ M EDTA z T-75 baněk. Tyto buňky se následně fluorescenčně označily 5 μ M roztokem Calceinu AM (Molecular Probes, Eugene, OR) ve sterilním PBS 1% BSA, přičemž toto značení se provádělo 30 min při 37 °C (Akeson a Woods, 1993). „Falešně“ transfektované COS-7 buňky se označily stejným způsobem. Označené buňky se potom 3x propláchly DMEM + 10% FCS ve snaze odstranit nezabudované značení, spočítaly a přidaly přímo do monovrstvy. Tyto 2 buněčné populace se nechaly vzájemně působit 1 h při 37 °C. Nepřilnulé buňky se odstranily třemi opatrnými průplachy monovrstvy pomocí DMEM + 10 FCS. Po propláchnutí se fluorescence každé z jamek kvantifikovala na mikroplotnovém fluorimetru. Fluorescence v jamkách obsahujících transfektované populace se porovnála s jamkami, do kterých se k COS-7 buňkám transfektovaným samotným pSI plasmidem přidaly buňky exprimující CD80.

Pro demonstraci specifčnosti této interakce, byly navrženy srovnávací vazebné testy, ve kterých se za použití CTLA-4 Ig a CD80 Ig fúzních proteinů (laskavě poskytnutých P. Linsleyem, Bristol-Meyers Squibb) inhibovaly interakce buňka/buňka. Po označení Calceinem, ale před přidáním buněk exprimujících CD80 do monovrstvy se CTLA-4 Ig v DMEM/FCS v koncentraci 1 μ g/ml 30 min inkuboval s označenými

transfektovanými buňkami. Buňky se 2x propláchly DMEM/FCS a přidaly do monovrstvy. Alternativně se buňky exprimující CD28 30 min inkubovaly v monovrstvě s CD80 Ig v koncentraci 1 µg/ml v DMEM/FCS a po propláchnutí se přidaly fluorescenčně značené buňky exprimující CD80. Inhibice vazby fúzními proteiny se hodnotila na základě srovnání fluorescence v těchto jamkách s fluorescencí pozorovanou v jamkách postrádajících konkurenty.

RT-PCR

U transfektovaných COS buněk se rovněž provedla RT-PCR analýza na mRNA transkripci. Po 3 dnech se z buněk transfektovaných z pSI obsahující feCD28, feCD80 nebo bez inzertu extrahovala RNA. RNA se ošetrila DNasou prostou RNasy ve snaze odstranit potenciál pro kontaminační DNA. 0,5 µg RNA se následně reverzně přepsalo na cDNA za použití oligo dT primeru a MuMLV reverzní transkriptasy. Každý cDNA vzorek se následně amplifikoval primerovou sadou specifickou pro CD28, CD80 a G3PDH za použití následujícího teplotního cyklu: 95 °C 5 min 1 cyklus; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30, cyklů; 72 °C 5 min, 1 cyklus. 20 µl Každé reakce se následně vizualizovala na 1% agarosovém gelu.

Výsledky

Geny pro kočičí CD28 a CD80 se úspěšně zavedly do tří protein exprimujících vektorů (pSI, SFV a pQE). Po ligaci do příslušného vektoru se geny použily pro transformaci

INVαF' kompetentních buněk. Obr. 33-38 znázorňují příslušné vektory se správnými cDNA inzerty. "

Vazebné testy se provedly ve snaze demonstrovat schopnost exprese funkčního proteinu. Cílem počátečních testů bylo stanovit vztah mezi navázáním CD28 a CD80 transfektovanými COS-7 buňkami a CD28 transfektovanými a „falešně“ transfektovanými COS-7 buňkami. Při počátečních dvou ředěních byly fluorescence v jamkách, do kterých se umístily fluorescenčně značené nepřilnavé CD80 transfektované buňky, vyšší než fluorescence v kontrolních jamkách. Interakce měla dávkovou odezvu a po počátečních dvou ředěních byl záchyt fluorescence v jamkách, ve kterých se nacházely přilnavé buňky exprimující na svém povrchu protein, a v jamkách, ve kterých se nacházely „falešně“ transfektované kontrolní buňky, stejný (obr. 39).

Ve snaze dokázat, že tuto interakci lze inhibovat, se ještě před smísením inkubovaly transfektované buněčné linie s rozpustným protireceptorem. Při koncentracích 5×10^5 a 1×10^5 buněk, byla fluorescence v jamkách obsahujících CD28 a CD80 exprimující COS buňky podobná fluorescenci pozorované při předchozím experimentu. V jamkách, ve kterých se přilnavé buňky inkubovaly před smísením s CD80 Ig protireceptorem, byla zachycená fluorescence srovnatelná s fluorescencí zjištěnou u kontrolních „falešně“ transfektovaných jamkách. Pokud se COS buňky transfektované s CD80 pSI před vystavením buněk buňkám transfektovaným CD28 pSI inkubovaly s rozpustným CTLA-4, potom nebyla fluorescence vůbec inhibována. I když úrovně nejsou tak významné jako v případě neinhibované skupiny, byly zcela jasně vyšší než kontrolní nebo druhá experimentální skupina (obr. 40).

RT-PCR se prováděla na RNA odvozené z COS-7 buněk transformovaných pSI-CD28, pSI-CD80 a „falešně“ transfektovaných ve snaze demonstrovat přítomnost mRNA specifické pro každý gen v buněčné linii. Obr. 32 ukazuje 1% agarosový gel pro každou buněčnou linii. Gen pro G3PDH se amplifikoval v každé sadě s cílem ukázat RNA integritu a jako pozitivní kontrola „falešně“ transfektované sady. CD80 pSI transfektované COS-7 buňky exprimovaly CD80 mRNA a G3PDH zprávu (message), zatímco CD28 pSI transfektované COS-7 buňky exprimovaly geny pro CD28 a G3PDH. „Falešně“ transfektované buňky exprimovaly pouze G3PDH (obr. 41).

Diskuse

Nedostatek vhodných protilátek znemožňuje provádění přímého testu, který by demonstroval expresi peptidu. Komerčně dostupné anti-hu CD28 a anti-hu CD80 monoklonální protilátky se testovaly na izolovaných lymfocytech s cílem stanovit, zda existuje křížová reaktivita. FACS analýza používající tyto protilátky potvrzená PCR, která měla prokázat expresi zprávy pro oba povrchové proteiny, byla neúspěšná. Tyto výsledky vedly v kombinaci se skutečností, že protilátky nerozpoznaly povrchovou expresi na pSI transfektovaných buňkách, k závěru, že tyto protilátky nejsou křížově reaktivní. Neočekávalo se, že by byla protilátky CD80 křížově reaktivní. Omezená homologie mezi lidskou a kočičí molekulou CD80 by omezila potenciál pro křížovou reaktivitu u monoklonálně odvozené protilátky. Nicméně je poněkud překvapivé, že křížově reaktivní není ani anti-hu CD28. Ačkoliv mezi klonovanými molekulami CD28 existuje vyšší stupeň konzervace, nebyla nalezena komerčně dostupná anti-hu CD28 protilátka, která by křížově

reagovala s myším proteinem. Stejně jako v případě anti-hu CD80 protilátky, bylo i testování hu CD28 monoklonálních látek neúspěšné. Bylo třeba vzít v úvahu, že by test mohl demonstrovat nejen pravděpodobnost, že dochází k expresi peptidů, ale rovněž to, že tyto peptidy jsou funkční a schopné interakce.

cDNA kočičí CD80 a CD28 byly úspěšně zavedeny do řady expresních vektorů. Zatímco pSI vektor splnil požadavky nezbytné pro provádění vazebného testu, další vektory mohly usnadnit budoucí proteinovou expresi.

Po transfekci se exprese CD28 a CD80 mRNA COS-7 transformovanými buněčnými liniemi potvrdila pomocí RT-PCR. Ošetření RNA DNasou před PCR reakcí by mělo významným způsobem redukovat jakoukoliv možnost genomové nebo plasmidové DNA kontaminace. Kromě toho se nepředpokládalo, že by COS-7 buňky přirozeně exprimovaly některý z ligandů, což se dále potvrdilo absencí zprávy pro oba povrchové proteiny u „falešně“ transfektovaných kontrolních buněk. Amplifikace správné zprávy od RNA z transfektovaných buněk pravděpodobně odráží skutečnost, že v buňkách je přítomen pSI templát a že zpráva kódovaná plasmidem byla přepsána.

Vazebné testy byly prováděny podle testů přizpůsobených P. Linsleyem, tak aby demonstrovaly podobnou vazebnou ochotu lidské molekuly CD80 a CD86 (Linsley a kol., 1994a). Modifikovaný formát se použil pro demonstraci skutečnosti, že je povrchově exprimovaná kočičí molekula CD28 navázána na povrchově exprimovanou kočičí molekulu CD80 a že jejich vzájemnou interakci lze inhibovat pomocí rozpustného receptoru. Úroveň navázání bylo možné odvodit na základě retence fluorescenčně značených buněk ve specifických jamkách. Protože se použil fluorescenční

plotnový čítač, nebylo nutné, aby se buňky před měřením fluorescence lyzovaly.

Počáteční test ukázal, že retence fluorescenčně značených CD80-pSI transfektovaných COS buněk je větší v jamkách, ve kterých se přilnulé buňky transfektovaly CD28-pSi, než v jamkách, ve kterých se přilnulé buňky „falešně“ transfektovaly. Kontrolní buňky, to je COS buňky „falešně“ transfektované pSI postrádající inzerter, zajistily, že ani přítomnost vektoru, tj. samotný transfekční proces, ani adhezivní vlastnosti buněk nezpůsobily adhezi mezi buňkami zprostředkovanou interakcí mezi povrchově exprimovanými molekulami CD80 a CD28. Při počátečním ředění 1×10^6 buněk byla fluorescence v jamkách, ve kterých buňky exprimovaly molekulu CD28, přibližně 5x vyšší než v jamkách, ve kterých byly do přítomných „falešně“ transfektovaných buněk zavedeny fluorescenčně značené CD80 transfektované buňky. Při ředění 5×10^5 buněk fluorescence významně poklesla díky snížení počtu buněk, ale její úroveň je stále podstatně vyšší než v kontrolních jamkách. Při koncentraci 1×10^5 buněk není rozdíl v úrovni fluorescence v experimentálních a kontrolních jamkách statisticky odlišitelný a při koncentraci 1×10^4 jsou úrovně fluorescence téměř identické. Tento test naznačuje, že interakce, která probíhá mezi CD80 transfektovanými a CD28 transfektovanými COS buňkami, má za následek zachycení fluorescenčně značených CD80 transfektovaných buněk v jamkách. Nicméně pokud přilnuté buňky neexprimovaly povrchový protein, potom bylo možné CD80 transfektované buňky odstranit opatrným opláchnutím. Tento účinek by mohl být odtitrován a při koncentraci 1×10^4 buněk byly fluorescence v buňkách v podstatě identická. Ve snaze potvrdit diskutovanou interakci se do jamek zavedly

rozpuštěné receptory, jejichž úkolem bylo inhibovat interakci CD28/CD80.

Druhý test zahrnoval zavedení rozpustných forem protireceptorů pro každý peptid, jehož cílem bylo pokusit se inhibovat interakci mezi adhezními partnery. Rozpustný receptor pro CD80, tj. hu CTLA-4 Ig, a rozpustný receptor pro CD28, tj. hu CD80-Ig, se inkubovaly s příslušnými transfektovanými COS-buňkami exprimujícími protireceptor jednotlivých molekul před smísením těchto dvou buněčných typů. Ačkoli rozpustné proteiny nebyly kočičího původu, bylo patrné, že vzhledem k úrovni konzervace mezi navrženou vazebnou oblastí lidské molekuly a analogickými oblastmi v kočičí molekule zde bude dostatečná křížová reaktivita. Kromě toho se lidští fúzní partneři váží se svými myšími protireceptory (P. Linsley, osobní konzultace). Vzhledem k počtu buněk potřebných pro test nebylo možné provést test s 1×10^6 buňkami. První koncentrací bylo 5×10^5 buněk, při které samotné CD28/CD80 transfektované buňky demonstrovaly střední fluorescenci podobnou fluorescenci z předchozího experimentu. Není zcela zřejmé, proč přilnulé buňky inkubované společně s rozpustným CD80 receptorem měli fluorescenci podobnou fluorescenci „falešně“ transfektovaných kontrolních buněk, zatímco nepřilnulé CD80 transfektované fluorescenčně značené buňky inkubované společně s rozpustným CTLA-4 měly přibližně 2x až 3x vyšší fluorescenci. Navzdory rozdílům vyvolaným typem rozpustného receptoru, došlo ke značnému snížení úrovně fluorescence v jamkách, do kterých byl zaveden rozpustný receptor v porovnání s jamkami, ve kterých nebyl přítomen žádný receptor. Interakci demonstrovanou předchozím testem lze inhibovat zavedením správného rozpustného protireceptoru před smísením zmíněných buněk.

Monoklonální protilátky specifické pro povrchové proteiny se obecně zdají být pro tento typ testu vhodné, za absence správných reakčních činidel, to znamená, že existuje životaschopný formát, pomocí kterého lze demonstrovat expresi funkčních protireceptorů. Výsledky počátečního vazebného testu v kombinaci s výsledky srovnávacího vazebného testu potvrdily izolaci funkční kočičí CD80 a CD28 cDNA a dále to, že proteiny exprimované uvedenou zprávou jsou funkčně interakční. Ačkoliv jsou aplikace tohoto typu vazebného testu omezené, zůstává tento vazebný test účinným systémem, na kterém lze demonstrovat pravděpodobnost funkční povrchové exprese a interakce.

Příklad 8

Infekce

Úvod

Lwoff definoval viry jako „striktně intracelulární a potenciálně patogenní entity s infekční fází, které 1) mají pouze jeden typ nukleové kyseliny, 2) množí se ve formě svého genetického materiálu, 3) jsou neschopné růstu a podléhají binárnímu dělení a 4) postrádají Lippmannův systém“ (Lwoff, 1957). Viry jsou necelulární povahy a jejich genom, ať už RNA nebo DNA řídí syntézu dalších virionů buňkou infikovaného hostitele (Luria a Darnell, 1968). Virová onemocnění představují zajímavý systém, na kterém lze demonstrovat praktické aplikace B7/CD28 signalizačního komplexu. Kromě retrovirů způsobuje narušení normální imunitní funkce i HIV u lidí a virus kočičí imunodeficiency (FIV) u koček. Předpokládá se, že k porušení normální imunitní funkce dochází v důsledku

eliminace $CD4^+$ T-buněk (Fauci a kol., 1984; Pedersen a kol., 1987). Předpokládá se, že $CD28/CD80$ signalizační komplex hraje určitou úlohu při těchto onemocněních a že by manipulace s expresí receptoru mohla infekci zmírnit (Harlan a kol., 1995).

FIV představuje velmi vážný klinický problém v případě domácích koček a způsobuje celou řadu klinických a subklinických projevů, které jsou blízce podobné HIV infekci u lidí (Pedersen a kol., 1987). Se shromažďování stále více informací o FIV se ukazuje, že právě FIV představuje vhodný zvířecí model pro lidský AIDS, který přesto, že není modelem primáta nejlépe simuluje vývoj této choroby u lidí (Siebelink, 1990). Molekulární biologická a patogenní podobnost rovněž ukazuje na to, že mnoho informací získaných při studiích HIV může urychlit pochopení FIV infekce u koček.

Na počátku se HIV infekce projevuje přechodnou lymfopenií za současného vývoje pseudomononukleotického syndromu přibližně v době serokonverze (Clark a kol., 1991). Potom následuje krátká perioda redukce $CD4^+$ T-buněčné populace a expanze $CD8^+$ T-buněk, která způsobí počáteční snížení poměru $CD4:CD8$, které může přispět k dalšímu snížení během asymptomatické fáze nemoci (Cooper a kol., 1984). S nástupem symptomů souvisejících s AIDS se významně redukuje $CD4^+$ T-buněčná populace a s postupující chorobou do její konečné fáze se drasticky sníží celá lymfocytická populace (Fauci a kol., 1984). Zatímco počáteční lymfocytopenie je pravděpodobně důsledkem kortiko-steroidně indukovaných posunů v imunitních buněčných populacích, jak je to patrné u dalších virových onemocněních, zdá se, že další $CD4^+$ T-buněčná ztráta a $CD8^+$ T-buněčná expanze souvisí s virovou proliferací a

patogenezi (Fauci a Dale, 1975; Fauci a kol., 1984). Vývoj vhodných modelových systémů je důležitým krokem pro další objasnění mechanismu infekce a virově indukované choroby.

FIV, tj. T-lymfotropní retrovirus, byl původně popsán u kočičí kolonie pocházející z Kalifornie, u které probíhaly často chronické infekce (Pedersen a kol., 1987). Ačkoliv se samotná choroba projevuje podobným způsobem jako HIV u lidí a ačkoliv je taxonomicky vzdáleně příbuzná, je antigenově vzdálená od kauzativního činitele AIDS u lidí (Siebelink a kol., 1990). K přenosu infekce dochází výměnou infikovaných tělních tekutin, jako v případě HIV, ale na rozdíl od HIV, u kterého se za primární cestu infekce považuje přenos pohlavním stykem, zdá se, že v případě FIV je hlavním přenosem infekce přenos prostřednictvím slin při pokousání (Yamamoto a kol., 1989). Navzdory rozdílnosti přenosu je výsledný syndrom imunodeficiency jedním z nejlepších modelů příbuzné nemoci u lidí (Siebelink a kol., 1990).

Klinický vývoj FIV je podobný jako u HIV a onemocnění se dělí na 5 klinických stádií. Počáteční stádium je charakteristické horečkou, malátností, nevolností, lymfadenopatií a dlouhou asymptomatickou fází, která následuje po infikaci a předchází nástupu konečných 3 stádií, při nichž dochází ke ztrátě hmotnosti a k vypuknutí celé řady sekundárních a oportunistických infekcí (English a kol., 1994). Ačkoliv není zcela zřejmé, jestli je cesta celulární infekce stejná je FIV tropický pro $CD4^+$ T-buňky a rovněž $CD8^+$ T-buňky (Brown a kol., 1991). U virově infikovaných zvířat dochází ke snížení $CD4^+$ T-buněčné aktivity pravděpodobně v důsledku tvorby syngtie a buněčné lyze (Siebelink a kol., 1990). Nástup konečného stádia se překrývá s významnou ztrátou $CD4^+$ T-buněk a snížení poměru

CD4:CD8 (Novotney a kol., 1990). HIV a FIV indukované onemocnění nemusí zprostředkovat CD4⁺ T-buněčnou ztrátu stejným způsobem, nicméně se zdá, že výsledný fenotyp a dysfunkce imunitního systému se projevují v podstatě stejným způsobem.

Ačkoliv je zřejmé, že infekce CD4⁺ T-buněk HIV nežádoucím způsobem ovlivňuje vývoj normální imunitní odezvy, nebyl doposud definován přesný mechanismus interakce, který způsobuje imunodeficienci. Události v pozdějších stádiích infekce vedoucí ke snížení množství CD4⁺ T-buněk nebyly definovány (Connor a kol., 1993). Zatímco se ukázalo, že vývoj syngtií, indukce apoptosy a eliminace pomocí CTL redukuje T-buněčné populace při HIV infekcích (Schattner a Laurence, 1994; Fouchier a kol., 1996), byl rovněž navržen CD28 mediováný mechanismus (Haffar a kol., 1995). Ukázalo se, že infikované T-buněčné linie snižují expresi CD28 po allo-antigenové stimulaci jak na úrovni proteinů, tak na úrovni mRNA (Haffar a kol., 1995). Jak již bylo diskutováno výše, navázání CD28 je důležitým signálem pro zrání T-buněčné odezvy (Linsley a kol., 1991a). Pokud HIV infekce vede ke snížení povrchové exprese CD28, potom se mohou infikované buňky, které rozpoznají antigen, stát apoptickými a nikoliv plně aktivovanými (Schattner a Laurence, 1994). Kromě toho, že lze apoptosu považovat za normální mechanismus HIV infikované buněčné smrti, může být tato dráha rovněž považována za další složku přispívající k doprovodné eliminaci T-buněk (Brinchmann a kol., 1994).

CD8⁺ CTL souvisí s vývojem dlouhodobého přežívání v případech HIV infekce, přičemž vysoké koncentrace CTL byly spojovány s dlouhodobým klidovým (neprogresivním) stádiem u osob infikovaných AIDS (Landay a kol., 1994). Na druhé

straně se ukázalo, že nejen že je humorální imunita zpravidla neúčinná při kontrole nemocí vyvolaných lentiviry, ale že protilátky mohou ve skutečnosti nemoc ještě zhoršit (Lombardi a kol., 1994; Siebelink a kol., 1995). Nástup konečného klinického stádia HIV infekce a doprovodná imunodeficiencie korelují se spuštěním buněčné odezvy typu 1 až humorální odezvy typu 2 (Schattner a Laurence, 1994). To odpovídá pozorování, podle kterých postup od zdravého stavu až po vyvinutí AIDS souvisí se snížením CD8⁺ CTL mediované antivirové aktivity (Lewis a kol., 1994). Rovněž se zdá, že exprese CD28 na CD8⁺ CTL souvisí s jejich antivirovou aktivitou, přičemž silná CTL mediovaná antivirová aktivita je spojován a s expresí CD28 na CD8 populacích u infikované osoby (Landay a kol., 1993).

Ačkoliv byla povrchová exprese CD28 navržena jako mediátor potřebný pro podporu HIV resistance, je nežádoucím způsobem ovlivněna přítomností HIV v infikovaných i neinfikovaných T-buňkách (Caruso a kol., 1994). Počínaje asymptomatickým stádiem HIV infekce se detekuje redukce procenta CD28 nesoucích CD4⁺ a CD8⁺ T-buněk (Lewis a kol., 1994). Předpokládá se, že se tato redukce může podílet na abnormalitách cytokinových sekrečních vzorů v počátečním stádiu infekce (Caruso a kol., 1994) a na změněných CD8⁺ T-buněčných odezvách v pozdějších stádiích (Zanussi a kol., 1996). Předpokládá se, že snížení proliferace CD8⁺ T-buněk u HIV infikovaných osob, k němuž dochází v ranném stádiu infekce, souvisí s redukcí CD28, protože v odezvě na IL-2 rostou pouze CD8⁺ T-buňky exprimující CD28 (Brinchmann a kol., 1994). Naneštěstí u infikovaných osob mohou CD28⁻, CD8⁺ T-buňky tvořit až 75 % CD8⁺ populace, zatímco u normálních osob tvoří pouze 25 % populace (Saukkonen a kol., 1993). Takže, zatímco u infikovaných osob může zůstat

CD8⁺ populace normální, může být nežádoucím způsobem ovlivněna a to i v počáteční fázi infekce účinnost této populace ve smyslu její schopnosti vytvořit účinnou antivirovou imunitní odezvu (Caruso a kol., 1994).

Studie rovněž ukázaly, že se na účinnosti viru může podílet CD28 signální transdukce (Asjo a kol., 1993; Smithgall a kol., 1995). Kostimulace HIV infikovaných periferních krevních CD4⁺ T-buněk anti-CD3 a anti-CD28 vede k vyšší virové replikaci než stimulace samotným anti-CD3 (Smithgall a kol., 1995). Tuto odezvu lze odstranit přidáním CTLA-4 Ig jako rozpustné formy CD80 receptoru a částečně redukovat přidáním anti-IL-2 (Smithgall a kol., 1995). Další studie s infikovanými CD4⁺ T-lymfocyty ukázaly, že u 40 % pacientů způsobila samotná CD28 ligace zvýšení produkce viru i bez potřeby dalších stimulů (Asjo a kol., 1993).

Předběžné ošetření lymfocytických populací HIV povrchovým glykoproteinem gp120 způsobilo redukcii CD80 na povrchu APC (Chirmule, 1995). Zatímco se zdá, že CD28 exprese na T-buňkách redukuje HIV infekci, exprese CD80 na těchto buňkách HIV infekci posiluje (Haffar a kol., 1993). Podle navrženého mechanismu, podle kterého lze infekci přenášet na neinfikované T-buňky, může interakce mezi CD28 na neinfikovaných T-buňkách a CD80 na infikovaných buňkách usnadnit kontakt buňky-buňka a umožnit přenos viru (Haffar a kol., 1993). Studie, které se zabývají účinky CD28 v rámci HIV zatím nedefinovaly úlohu tohoto povrchového proteinu v rámci FIV. Pokud by se u koček prokázaly podobné výsledky jako u lidského systému, bylo by to dalším potvrzením použitelnosti kočky jako retrovirového modelu.

Materiály a metody

Infekce *in vivo*

Tři dospělé specifického patogenu prosté (SPF) kočky se intravenosně infikovaly 1×10^5 TCID₅₀ Marylandského kmene FIV viru. Dvě podobné kočky, které se „falešně“ infikovaly sérem neobsahujícím virus, se následně použily jako kontrolní modely. Odběr krve se provedl před infikací a následně každý týden po dobu 7 týdnů. První týden po infikaci se kočky monitorovaly 2x denně, aby se zajistilo, že nedojde k žádné počáteční reakci, která by byla způsobena aplikací injekce. V průběhu infekce se zvířata monitorovala 1x denně. Každý týden v průběhu akutního stádia klinické nemoci se odebralo 5 až 10 ml krve pro stanovení CBC a izolaci PBMC. Stanovené CBC se realizovalo sečtením buněčných typů rychlým ponořením v získaném krevním nátěru („dip-quick stained blood smear“) (Jorgensen Lab., Loveland, CO).

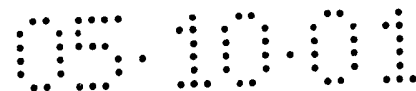
PBMC se extrahovaly z krve separací přes gradient Histopaque (Sigma, St. Louis, MO). Po počátečním propláchnutí Alseverovým roztokem se přibližně 5×10^5 buněk vyjmulo a rozdělilo do 5 jamek 48jamkové plotny. Buňky se resuspendovaly v 500 μ l kompletního RPMI a následně označily protilátkami zaměřenými na CD4 nebo CD8. Po hodinové inkubaci při pokojové teplotě a při mírném protřepávání se buňky 2x propláchly PBS. Po propláchnutí se v koncentraci 1:500 přidala druhá protilátka, kozí antimyšší IgG (H+L) FITC značená (KP&L, Gaithersburg, MD) a buňky se inkubovaly 1 hodinu při pokojové teplotě a za mírného protřepávání. Buňky se následně 3x propláchly PBS a fixovaly 3,7% formaldehydem. Fluorescenčně značené populace

se následně kvantifikovaly na FACSCalibur průtokovém cytometru.

Zbývající PBMC se propláchly 10 ml Alseverova roztoku. Po odstředování se odstranil supernatant a s cílem extrahovat RNA se přidal 1 ml ULTRASPEC (Biotexc, Houston, TX). RNA se purifikovala a vysrážela již popsáním způsobem. Koncentrace se následně kvantifikovala měřením absorbance při 260 nm na spektrofotometru. RNA se následně resuspendovala v 50 μ l vody ošetřené DEPC a zamrazila při -70 °C pro pozdější použití.

Semi-kvantitativní RT-PCR

Před PCR amplifikací vzorku RNA se kočce, u které se prováděl poslední odběr, odebralo 60 ml krve. PBMC se izolovaly již popsáním způsobem. Na hemacytometru se stanovil počet buněk a buňky se rozdělily do 4 lahví v koncentraci 5×10^5 buněk/ml. Buňky se 0, 8, 16 a 24 hodin před odstředováním a extrakcí RNA z buněčné pelety za použití činidla ULTRASPEC stimulovaly pomocí Con A. RT-PCR se prováděla za použití 1,5 μ g RNA přeepsané na cDNA pomocí MMLV reverzní transkriptasy a oligo dT3'primeru. RNA, dT primer a dH₂O ošetřené DEPC se inkubovaly 5 minut při 70 °C ve snaze odstranit sekundární strukturu RNA a umožnit temperování primeru. Potom se přidal transkripční puf, MgCl₂, dNTP a DTT a směs se inkubovala 2 min při 42 °C. Potom se přidal 1 μ l reverzní transkriptasy a reakce se nechala probíhat 30 min. Do každé ze tří zkumavek pro amplifikaci CD80 a do tří zkumavek pro amplifikaci CD28 se přidaly 4 μ l z 25 μ l RT reakce. K cDNA se potom přidala směs 10X PCR pufu, dNTP a primeru specifického pro CD28 nebo CD80. Primery pro CD80 byly:



B7-S220 5' primer: CAT GTC TGG CAA AGT ACA AG

B7-284 3' primer: TTA TAC TAG GGA CAG GGA AG

Zatímco primery použitými pro CD28 byly :

CD28 5' start: CGC GGA TCC ACC GGT AGC ACA ATG ATC CTC AGG

CD28-239 3': ATT TTG CAG AAG TAA ATA TCC

Tři zkumavky pro každý produkt se následně inkubovaly 5 min při 95 °C, načež se do každé zkumavky přidalo 0,25 µl Taq polymerasy v 10 µl vody. Reakce se podrobily cyklům s následujícím teplotním profilem: 95 °C 30 s, 55 °C 30 s a 72 °C 30 s. Zkumavka se vyjmula po 20, 25 resp. 30 cyklech. 20 µl Každé reakce se vizualizovalo na 1% agarosovém gelu. Agarosový gel se vyfotografoval a stanovil se počet cyklů, při kterých se objevil produkt. Po těchto předběžných experimentech se podobným způsobem amplifikovala RNA již dříve extrahovaná z infikovaného a kontrolního zvířete.

Infekce *in vitro*

In vitro FIV infikované T-buněčné linie se stimulovaly 0 až 16 h pomocí Con A a exprese CD28 a CD80 se stanovila semikvantitativní RT-PCR metodou. FETJ buněčná linie se smísila s T-lymfocytovou populací, která rostla v růstovém médiu v nepřítomnosti IL-2. Nezávislé subpopulace těchto buněk byly vystaveny kmenu FIV viru Maryland a Petaluma. Přibližně 20 milionů normálních kmenem Petaluma infikovaných a kmenem Maryland infikovaných FETJ se stimulovalo po dobu 0 až 16 hodin 8 mg/ml Con A. Po inkubaci s RNA extrahujícím činidlem ULTRASPEC (Biotexc,

Houston, TX) se z těchto buněk extrahovala RNA, která se následně purifikovala již popsáním způsobem.

MCH 5.4 je T-buněčná linie odvozená z kočky v kolonii, která měla více FIV infekcí, ačkoliv tato linie nepředstavuje chronicky FIV infikovanou linii. Přibližně 20 milionů MCH 5.4 buněk se peletovalo odstředováním a resuspendovalo v 5 ml koncentrovaného FIV infikovaného supernatantu. Při této koncentraci se buňky inkubovaly 30 minut v 5% CO₂ inkubátoru při 37 °C, načež se koncentrace nastavila na přibližně 5x10⁵ a buňky se kultivovaly následujících 24 h. Potom se normální a infikované MCH 5.4 stimulovaly 0 až 16 h 8 mg/ml Con A. RNA se extrahovala pomocí RNA extrahujícího činidla ULTRASPEC (Biotexc, Houston, TX) a purifikovala již popsáním způsobem.

Northernový přenos

Při analýze northernovým přenosem se koncentrace RNA určily spektrofotometrickou analýzou při 260 nm. 15 µg Každého vzorku RNA se zahustilo na 3 µg/ml a resuspendovalo ve 3 objemech pufru nesoucího vzorek. Vzorky se potom 15 min ohřívaly na 70 °C ve snaze denaturovat RNA a odstranit sekundární strukturu. Vzorky se v objemu 20 µl umístily na 1% denaturační agarosový gel a následně se podrobily elektroforetické separaci při 70 V, která se prováděla 2,5 h až do okamžiku, kdy hrana bromofenolového modrého barviva dosáhla výšky gelu 2 cm ode dna. RNA se vlivem kapilárních sil následně přenesla z gelu na nylonovou membránu Genescreen (Dupont NEN, Boston, MA). RNA se třiminutovou expozicí UV záření o nízké intenzitě

navázala na membránu, načež se UV zastíněním vizualizovaly pruhy ve snaze určit integritu ribosomálních pásů.

Za použití značení nahodilým cDNA primerem se zkonstruovala sonda specifická pro kočičí CD28. Celodélková molekula CD28 se vystříhla z TA klonovacího vektoru pomocí ohraničujících *EcoRI* míst. Tento fragment se purifikoval gelovou elektroforézou a extrahoval z agarosy pomocí gelového nebulizeru Amicon (Amicon, Beverly, MA). 25 ng Purifikovaného produktu se inkubovalo s nahodilými dekamery 5 min při 95 °C ve snaze odstranit sekundární strukturu (Ambion, Austin, TX). Reakce se následně zastavila zmrazením v kapalném dusíku a do směsi se přidal dATP postrádající dNTP a P³²αdATP. Po 1min inkubaci při 37°C se přidal 1 μl Klenowy DNA polymerasy a směs se inkubovala 30 min. Reakce se zastavila přidáním 1 μl 0,5 M EDTA a následně purifikovala odstředivou kolonou Sephadex G50 (Sigma, St. Louis, MO) ve snaze odstranit nezabudovaný radiologicky značený nukleotid. 1 μl Reakční směsi se naředil v 1 ml scintilační tekutiny a aktivita sondy se stanovila na scintilačním čítači. Přenosy se přehybridizovaly v 5 ml hybridizační tekutiny Rapid Hyb (15 min, 65 °C) (Amersham Life Science, Cleveland, OH). Do každého přenosu se přidalo 5 μl sondy v koncentraci 3 až 5x10⁶ CPM/μl a inkubovalo při 65 °C a za otáčení po dobu 1,5 h. Sonda se odstranila a přenosy se 2x propláchly v 1% SSC/0,1% SDS (15 min při pokojové teplotě). Přenosy se následně analyzovaly pomocí Giegerova čítače a v případě potřeby opět propláchly při 65 °C. Značení se kvantifikovalo na skenovacím zařízení Betagen. Potom se provedl poslední průplach při 65 °C (15 min) a přenosy se umístily na 16 až 24 h na fólii, kde byly nepřetržitě screenovány při -78 °C. Pořídil se autoradiograf a pásy se

kvantifikovaly pomocí hustometru. RNA integrita a koncentrace se potvrdily sondou specifickou pro G3PDH (laskavě poskytl Prof. J. Piedrahita, Texas A&M University) značenou a hybridizovanou podobným způsobem.

Semi-kvantitativní RT-PCR z *in vitro* infikovaných buněk

Přítomnost CD28 se dále zjišťovala semi-kvantitativní PCR. Jak již bylo popsáno výše, koncentrace extrahované RNA se určila spektrofotometrickými odečty při 260 nm. 2 µg RNA (konečný objem 25 µl) se přepsaly za použití oligodT primerů a MMLV reverzní transkriptasy již popsaným způsobem do cDNA. 3,5 µl RT reakce se následně přemístilo do 7 PCR zkumavek. 3 Zkumavky se amplifikovaly za použití primerů specifických pro CD80, 3 zkumavky se amplifikovaly za použití primerů specifických pro CD28 a zbývající zkumavka se amplifikovala primery specifickými pro G3PDH:

G3PDH 5': CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA T

G3PDH 3': CCA AAG TTG TCA TGG ATG ACC

Zkumavky se, jak již bylo popsáno, vyjmuly po 20, 25 a 30 cyklech. 20 µl každého vzorku se vizualizovalo na 1% agarosovém gelu. Přítomnost určitých cytokinů odvozených z T-buněk se podobně analyzovala z RNA FETU a MCH 5.4 buněk. Pro amplifikaci cDNA přepsané z 1,25 µg RNA se použily primery specifické pro:

IL-2 5': CAA CCC CAA ACT CTC CAG GAT G

IL-2 3': GGT CAG CGT TGA GAA GAT GCT TTG

IL-4 5': TAT TAA TGG GTC TCA CCT ACC

IL-4 3': TTG GCT TCA TTC ACA GAA CAG

IFN γ 5': GGG TCG CTT TTC GTA GAC ATT TTG

IFN γ 3': CAG GCA GGA CAA CCA TTA TTT C

20 % transkripční reakce se amplifikovalo pro každý cytokin. Zbývající cDNA se amplifikovala za použití primerů specifických pro G3PDH. cDNA se amplifikovala ve 30 cyklech s následujícími parametry: 95 °C 5 min 1 cyklus; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s 30 cyklů; 72 °C 5 min 1 cyklus. 20 μ l Reakce se následně vizualizovalo na 1% agarosovém gelu.

RT-PCR určující infekci

Infekce FETJ a MCH 5.4 buněk se potvrdila RT-PCR amplifikací sekvence specifické pro *gag*. RNA se za již popsaných parametrů a za použití MMLV RT a 3'primeru specifického pro *gag* přepsala v koncentraci 1,25 μ g do cDNA. 10 μ l RT reakce se amplifikovalo pomocí PCR s horkým startem za použití následujících parametrů: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 cyklů; 72 °C 5 min. Po amplifikaci se 20 μ l každého vzorku vizualizovalo na 1% agarosovém gelu.

Výsledky

Ve snaze určit vliv akutní *in vivo* infekce na expresi CD28 se kočky AU04, AUU3 a OAC2 infikovaly intravenózní injekcí virem, zatímco kočky AWG3 a OHE6 se injekovaly

samotným médiem. FACS analýza ukázala určité rozdíly mezi poměry CD4 ku CD8 mezi experimentálními a kontrolními zvířaty. Zatímco kontrolní zvířata si v podstatě zachovala téměř konstantní poměr přibližně 2:1 v experimentální skupině došlo k určitému kolísání a tento poměr poklesl u jednoho zvířete až na 1:1 (tabulka 3).

Tabulka 3: Poměry CD4:CD8 T-lymfocytů z PBMC odebraných akutně infikovaným a neinfikovaným kočkám

CD4:	WK1	WK2	WK3	WK4	WK5	WK6	WK8
CD8							
INFEC							
TED							
AU0 4	1,5	N/D	1,9	1,2	1,0	1,5	1,6
Auu 3	N/D	2,3	2,9	1,3	1,2	1,1	2,1
OAC2	2,8	1,48	2,3	1,9	1,1	1,14	1,1
UNINF							
ECTED							
AWG 3	2,6	1,5	1,9	2,0	1,8	1,9	2,2
OAE 6	2,1	1,5	1,9	1,2	1,8	2,0	2,0

Stanovil se časový průběh exprese CD80 a CD28 RNA s cílem demonstrovat, že zpráva pro každou molekulu byla přítomna a bylo možné jí amplifikovat pomocí PCR v časových bodech 0, 8, 16 a 24 hodin po Con A stimulaci. Tento semi-kvantitativní PCR postup se snaží detekovat viditelný pás pro nejnižší počet amplifikovaných cyklů, který by mohl být označen jako relativní míra zprávové abundance. V žádném okamžiku po infekci po 20 a 25 cyklech se neobjevil definitivní pás specifický pro CD80, ačkoliv po 30 cyklech byla na gelu každé experimentální skupiny viditelná zpráva CD80 (obr. 42). CD28 zpráva byla také viditelná v každém okamžiku po 30 cyklech, ačkoliv po 16 hodinách od stimulace

Con A byl pás po 25 cyklech rovněž špatně viditelný (obr. 43).

Podobný protokol se použil u RNA extrahované z PBMC FIV infikovaných a neinfikovaných koček. RT-TCR amplifikace RNA specifické pro CD28 a CD80 se použila k demonstraci podobné myšlenky i pro správu přepsanou pro každý peptid. Stejně jako u experimentu s časovým průběhem se vzorky vyjmuly po 20, 25 a 30 cyklech. Po 20 cyklech nebylo možné detekovat žádnou zprávu, ačkoliv po 25 cyklech byl viditelný produkt CD80 i CD28 (tabulka 4). Nebyly zaznamenány žádné výrazné rozdíly při expresi jednotlivých zpráv mezi experimentálními a kontrolními skupinami. Mezi oběma podsoubory byly zjištěny výchyly ve smyslu časového okamžiku amplifikačního cyklu, ve kterém byl produkt viditelný.

Tabulka 4: Semi-kvantitativní stanovení CD80 a CD28 RT-PCR produktů amplifikovaných z infikované a neinfikované PBMC RNA v určitých intervalech v průběhu akutního stádia FIV infekce

CYC	NO	PRE	INF	WK1	WK3	WK4	WK6	WK8
B/C infikované								
AU0	4	30/30	30/30	30/30	30/30	-/25	30/25	25/25
AUU	3	30/30	30/30	30/30	25/25	-/25	30/25	-/30
OAC2		30/30	30/30	30/30	30/30	-/30	25/30	25/25
Neinfikované								
AWG	3	25/30	30/30	30/30	30/25	-/30	30/25	25/25
OAE	6	30/30	-/30	-/30	-/30	-/25	30/30	25/25

PCR amplifikace mRNA z FETJ a MCH 5.4 buněčných linií prováděná za použití primerů specifických pro FIV gag ukázala, že MCH 5.4 buněčná linie byla infikovatelná a

přenesena účinnou infekcí, zatímco FETJ buněčné linie neposkytly amplifikovanou RNA specifickou pro *gag*. Produkt specifický pro FIV byl snadno amplifikovatelný z RNA extrahované z infikovaných MCH 5.4 vzorků, ale nikoliv z RNA extrahované podobným způsobem z neinfikovaných kontrolních vzorků (obr. 44). Podobné reakce prováděné na RNA extrahované z FETJ buněčných linií vystavených působení kmene FIV Petaluma a Maryland neposkytly za podobných podmínek viditelné produkty (údaje nejsou uvedeny).

Northernový přenos a semi-kvantitativní PCR, jejichž úkolem bylo detekovat CD28 zprávu, se prováděly na normálních FETJ a MCH 5.4 buněčných liniích. MCH 5.4 buněčná linie měla infikovanou experimentální skupinu a neinfikovanou kontrolní skupinu, zatímco FETJ buněčná linie se použila jako nepermissivní T-buněčná kontrola.

Semi-kvantitativní PCR ukázala, že každá buněčná linie je schopná produkovat CD28 zprávu. Amplifikace v FETJ neinfikované kontrolní skupině ukázala expresní vzor podobný expresnímu vzoru zaznamenanému v témž časovém okamžiku výše diskutované exprese CD28. Zatímco v nulté hodině po stimulaci bylo možné detekovat viditelný pás až po 30 cyklech, v 26. hodině po stimulaci byl pás viditelný již po 25 cyklech (obr. 45). Podobný vzor byl pozorován i v případě neinfikované MCH 5.4 buněčné linie, kdy v 0. hodině nebyl před 30 cykly patrný žádný pás, zatímco po 16 hodinách inkubace byly pásy viditelné již po 25 cyklech. Je zajímavé, že infikovaná MCH 5.4 buněčná linie vykazovala vzor, který se lišil od vzoru všech kontrolních skupin. V experimentální skupině nebyla v 0. nebo 16. hodině před 30 cykly viditelná žádná zpráva. Jako kontrola, která měla zajistit integritu a koncentraci RNA, se amplifikovala

G3PDH zpráva (obr. 46). Zdá se, že infekce ovlivnila expresi zprávy CD28 RNA.

Pro potvrzení údajů zjištěných za použití semi-quantitativní RT-PCR technologie se použil northernový přenos. RNA získaná z MCH 5.4 buněk 16 hodin po stimulaci Con A, které nebyly infikovány, vykazovala nejsilnější hybridizaci sondou. U nestimulovaného vzorku získaného z neinfikované linie bylo dosaženo vyšší rychlosti hybridizace než u RNA stimulované nebo nestimulované infikované MCH 5.4 buněčné linie (obr. 47).

Kromě pořízení autoradiografů se provedla měření radioaktivity na měřicím přístroji BetaGen. Hrubé odečty získané při hybridizaci CD28 se standardizovaly s odečty získanými z následné GAPDH sondy přenosu (obr. 48) (tabulka 5).

Tabulka 5: Normalizované odečty pro CD28 northernové přenosy z měřicího přístroje BetaGen

		G3PDH	CD28	CD28 norm.
MCH5.4	nor	14995	14921	14807
MCH5.4	Con A	13336	13270	15430
MCH5.4	inf	16700	10854	9867
MCH 5.4	I Con A	15112	11077	10967

RT-PCR amplifikace cytokinové RNA z MCH 5.4 buněčné linie ukázala amplifikovatelnou zprávu pouze pro IL-2. IL-2 zpráva byla snadno detekovatelná, zatímco IL-4, IL-6 ani IFN γ nebylo možné amplifikovat ani ve 30 cykly (obr. 49).

Diskuse

CD28 zpráva se měřila při *in vivo* a *in vitro* infekci ve snaze určit, zda lze analyzovat expresi CD28 a zda infekce retrovirem ovlivní expresi zprávy. Pokud by bylo možné izolovat dostatek RNA, potom by bylo možné CD28 měřit northernovým přenosem a pokud by byla izolace omezena, potom by bylo možné použít semi-kvantitativní RT-PCR analýzu.

Po *in vivo* experimentech se již popsáním způsobem 3 zvířata infikovala kmenem Maryland FIV a z takto infikovaných zvířat a neinfikovaných zvířat se odebrala krev, ze které se izolovaly PBMC a RNA extrahovaná z těchto buněk se použila pro amplifikaci zprávy specifické pro CD28 a CD80. Ačkoliv se zdá, že by použití northernového přenosu mohlo být výhodnější, použila se vzhledem k omezenému počtu buněk a množství dostupné RNA semi-kvantitativní RT-PCR. Kočkám se odebrala krev v týdenních intervalech, takže pro každý experiment bylo k dispozici maximálně 10 ml krve.

Ve srovnání s neinfikovanými zvířaty se poměr CD4/CD8 PBMC infikovaných zvířat v průběhu 8 týdnů snížil (jak ukázaly výsledky FACS analýzy), zatímco u neinfikovaných zvířat zůstaly tyto poměry relativně konstantní. Mezi 2 experimentálními skupinami bylo možné pozorovat určité rozdíly. Ačkoliv byly poměry CD4/CD8 infikovaných a neinfikovaných zvířat rozdílné, v případě exprese CBC nebo CD80 a CD28 nebyly detekovány žádné skutečné rozdíly (údaje nejsou uvedeny).

Pro optimální stanovení exprese CD28 bylo třeba získat čisté T-buňky. Z izolovaných PBMC bylo průměrně asi 40 % buněk skutečnými T-buňkami. Z těchto buněk představuje až

polovina CD8⁺ T-buňky, které neexprimují CD28 ve stejné koncentraci jako CD4⁺ T-buňky. Toto ve spojení s faktem, že v ostatních druzích klidové T-buňky neexprimují vysoké koncentrace CD28, vedlo k rozhodnutí použít spíše než northernový přenos PCR analýzu. Předběžné experimenty, které se pokoušely detekovat CD28 zprávu z 20 µg RNA extrahované z PBMC, byly neúspěšné. Semi-kvantitativní RT-PCR reakce detekovala přítomnost RNA kódující CD28. Tato technika se rovněž použila pro amplifikaci zprávy specifické pro CD80.

RNA, ze které se northernovým přenosem detekovala zpráva CD28, se získala *in vitro* z buněčných linií. Jako T-buněčná linie se zvolila MCH 5.4, protože všechny její buňky potenciálně exprimují zprávu CD28 a odvozená linie již zakotvenou chronickou virovou infekcí. Konečným úspěchem bylo, že v případě této buněčné linie byla dostupná mnohem větší zásoba RNA než při použití lymfocytů získaných z krve extrahované z jediného zvířete.

Rovněž byly provedeny pokusy detekovat zprávu CD80 northernovým přenosem. Zatímco CD80 je v nízké koncentraci přítomna na klidových B-buňkách a monocytech, na stimulovaných monocytech a makrofágách byly zjištěny nejvyšší stupně exprese. Kočičí antigen prezentující buněčné linie byla nedostupná a T-buňky exprimovaly za normálních okolností peptid pouze v nízké koncentraci. Experimenty, které měly detekovat zprávu RNA extrahované z PBMC specifickou pro CD80, byly neúspěšné pravděpodobně z podobného důvodu jako pokusy prováděné s již diskutovanou molekulou CD28. Alternativně se na buňky odvozené z infikovaných zvířat použila semi-kvantitativní PCR, která měla demonstrovat zprávu CD80 a CD28. Ačkoliv nebyla získána definitivní odpověď ve smyslu kvantity zprávy,

demonstroval tento test přítomnost zprávy a související obraz abundance.

Analýza northernovým přenosem CD28 zprávy z kočičí ZT-buněčné linie byla neúspěšná. Při srovnání zprávy pro CD28 v infikovaných a neinfikovaných buňkách byly zjištěny rozdíly v expresních vzorech. Nejvyšší výskyt zprávy CD28 byl zjištěn u neinfikovaných buněk po 16hodinové expozici Con A. Zpráva byla rovněž detekována v nestimulovaných a neinfikovaných buňkách. I když byla detekována zpráva v RNA ze stimulovaných a nestimulovaných FIV infikovaných buněk, byly jejich koncentrace podstatně nižší než u neinfikovaných buněk. Tyto výsledky odpovídají podobným zjištěním, které poskytla RT-PCR detekční technika. Schopnost detekovat zprávu CD28 byla limitována stejnými překážkami jako v případě molekuly CD80. Nicméně pokud by bylo možné izolovat větší populaci CD80 exprimujících buněk, potom by byla určitá pravděpodobnost, že půjde tuto zprávu detekovat pomocí northernového přenosu. Pokud se pro tyto povrchové proteiny vyvinou monoklonální protilátky specifické pro uvedený peptid, potom bude zajímavé vynést koncentraci zprávy do závislosti na množství povrchové exprese pro každý peptid.

Cytokinová cDNA se amplifikovala ve snaze potlačit veškeré rozdíly mezi infikovanými a neinfikovanými liniemi. IL-2 se amplifikovala z každé skupiny bez ohledu na stav infekce. Žádná další cytokinová zpráva se neamplifikovala.

Northernův přenos naznačil, že přítomnost FIV redukoval *in vitro* expresi CD28 na úrovni mRNA. Přesto, že by toto zjištění mělo být potvrzeno měřením exprese povrchového proteinu, zdá se, že infekce FIV *in vitro* může

ovlivnit expresi CD28 jak v případě lidských T-buněk infikovaných HIV (Brinchmann a kol., 1994).

Závěr

Klonování a sekvencování cDNA kódující CD28 a CD80 signalizační komplex z kočičího systému poskytlo produkt analogický s molekulami izolovanými z jiných systémů. I když domnělá aminokyselinová sekvence kočičího proteinu vykazovala relativně nízkou identitu s lidským a myším polypeptidem, porovnáním homologie s již dříve klonovanými molekulami, retence charakteristických zbytků a skutečnost, že se nepředpokládá, že by měl povrchový ligand signalizační funkci, vedly k závěru, že izolovaný produkt je ve skutečnosti analogem CD80. Na druhé straně si kočičí molekula CD28 zachovala pouze mírnou identitu, jak na úrovni nukleové kyseliny, tak na úrovni domnělé aminokyseliny a byla analogem s molekulami klonovanými v jiných druzích.

Povaha molekul se dále identifikovala demonstrací interakce ve vazebných testech. Monoklonální protilátky působící proti analogickým proteinům v jiných druzích nemohly reagovat s exprimovanými kočičími proteiny. Byla tedy navržena sada vazebných testů, které by demonstrovaly, že došlo k interakci a že tuto interakci bylo možné inhibovat rozpustným receptorem. U těchto testů se navázání demonstrovalo zachycením fluorescenčně značených buněk, které bylo možné inhibovat zavedením rozpustných protireceptorů. Tyto testy demonstrovaly nejen to, že je možné exprimovat proteiny pro kočičí CD80 a CD28, ale

rovněž možnost interakce mezi povrchově exprimovanými molekulami.

Rovněž se charakterizovala exprese molekul u aktivní infekce. Expresy CD28 a CD80 se zjišťovala v *in vivo* a *in vitro* systémech exponovaných FIV virem. Ukázalo se, že exprese CD28, která je v lidských buňkách infikovaných HIV virem ovlivňována (Asjo a kol., 1993), je rovněž nežádoucím způsobem ovlivňována FIV infekcí kočičích T-buněk. Mělo by se pokračovat ve shromažďování informací týkajících se exprese každé z těchto molekul v průběhu vývoje choroby a vytvořit tak kočičí systém jako důležitý model retrovirové infekce.

Dlouhodobé používání těchto molekul má obrovské možnosti. Pochopení imunitních systémů vývojově odkloněných od lidského systému, může vést pouze k lepšímu pochopení způsobu fungování lidského systému. Důležitost kočičích druhů jako modelu retrovirové infekce byla jasně stanovena (Siebelink a kol., 1990). Molekula CD80 byla navržena jako potenciální adjuvans pro indukci paměťových CTL v antiretrovirových vakcínách. Kočičí systém by mohl být výlučným modelem, na kterém by se testovala účinnost tohoto systému.

Reference

- Azuma, M. a kol., *J. Immunology* **149**, 1115-1123 (1992).
- Azuma, M. a kol., *Nature* **366**, 76-79 (1993).
- Chambers a kol., *Current Opinion in Immunology* **9**, 396-404 (1997).
- Chen a kol., *J. Immunology* **148**, 2617-2621 (1992).
- Chen a kol., *Cell* **71**, 1093-1102 (1992).
- Donnelly JJ a kol., *Annu Rev Immunol* 1997; **15**: 617-648.
- Freeman a kol., *J. Immunology* **143**, 2714-2722 (1989).
- Freeman a kol., *J. Exp. Med.* **174**, 625-631 (1991).
- Gimmi a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6575-6579 (1991).
- Hathcock a kol., *J. of Exp. Med.* **180**, 631-640 (1994).
- Hassett a Whitton, *Trends Microbiol* 1996; **4**: 307-312.
- Linsley a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5031-5035 (1990).
- Jenkins a kol., *J. Immunology* **147**, 2461-2466 (1991).
- Riley a kol., *J. Immunology* **158**, 5545-5553 (1997).
- Tsuji a kol., *Eur J Immunology* **27**(3), 782-787 (1997).
- PCT mezinárodní patentová přihláška WO 92/00092, Bristol Myers Squibb.

PCT mezinárodní patentová přihláška WO 92/15671, Cytomed, Inc., 17. září 1992.

PCT mezinárodní patentová přihláška WO 93/00431, Bristol Myers Squibb, 7. leden 1993.

Akeson, A.L. a Woods, C.W. (1993). A fluorometric assay for the quantitation of cell adherence to endothelial cells. *J. Immunol. Meth.* **163**, 181-185.

Allison, J.P. a Lanier L. (1987). The structure, serology, and function of the T-cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **5**, 503-540.

Allison, J.P. (1994). CD28-B7 interaction in T-cell activation, *Current Opinion Immunol.* **6**, 414-419.

Anderson, P., Morimoto, C., Breitmeyer, J.B., Schlossman, S.F. (1988). Regulatory interactions between members of the immunoglobulin superfamily. *Immunol Today* **9**, 199-203.

Antonia, S.J., Munoz, -Antonia, T. Soldevila, G., Miller, J., Flavell, R.A. (1995). B7-1 expression by a nonantigen presenting cell- derived tumor. *Can. Res.* **55**, 2253-2256.

Arima, T., Rehman, A., Hickey, W., Flye, M. (1996). Inhibition by CTLA-4Ig of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* **156**, 4917-4924.

Arrufo, A. a Seed, B. (1987). Molecular cloning of a CD28 cDNA by a COS cell expression system. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **84**, 8573-8577.

Asjo, B., Cefai, D. Debre, P., Dudoit, Y., Autran, B. (1993). A novel mode of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activation: ligation of CD28 alone induces HIV-1

replication in naturally infected lymphocytes. *J. Virol.* **67**, 4395-4398.

Azuma, M., Cayabyab, M., Buck, M., Phillips, J.H., Lanier, L.L. ((1992). Involvement of CD28 in MHC unrestricted-cytotoxicity mediated by human killer leukaemic cell line. *J. Immunol.* **149**, 1115-1123.

Azuma, M., Yssel, H., Phillips, J.H., Spits, H., Lanier, L.L., (1993b). Functional expression of B7/BB1 on activated T-lymphocytes. *J. exp. Med.* **177**, 845-850.

Azuma, M., Cayabyab, M., Phillips, J.H., Lanier, L.L., (1993c). Requirements for CD28-dependant T cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* **150**, 2091-2101.

Bajorath, J., Stenkamp, R., Aruffo, A. (1993). Knowledge based protein modeling: concepts and examples. *Prot. Sci.* **2**, 1798-1810.

Bajorath, J., Peach, R., Linsley, P.S. (1994). Immunoglobulin fold characteristics of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86). *Prot. Sci.* **3**, 2148-2150.

Balazano, C., Buonavista, N., Rouvier, E., Golstein, P., (1992) CTLA-4 and CD28: similar proteins, neighbouring genes. *Int. J. Can. Suppl.* **7**, 28-32.

Barcy, S., Wettendorf, M., Leo, O., Urbain, J., Kruger, M., Ceuppens, J.L., de Boers, M. (1995). FcR crosslinking on monocytes results in impaired T cell stimulatory capacity. *Int. Immunol.* **7**, 179-189.

Beale, D. (1985). A comparison of the amino acid sequences of the extracellular domains of the immunoglobulin

superfamily. Possible correlations between conservancy and conformation. *Comp Biochem Physiol.* **80**, 181-194.

Bellone, M., Iezzi, G., Manfredi, A.A., Protti, M.P., Dellabona, P., Casorati, G., Rugarli, C. (1994). *In vitro* priming of cytotoxic T lymphocytes against poorly immunogenic epitopes by engineering antigen presenting cells. *Eur. J. Immun.* **24**, 2691-2698.

Berke, G. (1993). The function and mechanisms of action of cytolytic lymphocytes. In "Fundamental Immunology," (W. Paul), str. 965-1014. New York: Raven Publ. 3. vydání.

Berke, G. (1994). The binding and lysis of target T-cells by cytotoxic lymphocytes. *Annu. Rev. of Immunol.* **12**, 735-773.

Boise, L.H., Minn., A.J., Noel, P.J., June, C.H., Accavitti, M., Lindstein, T., Thompson, C.B. (1993). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-x_L. *Immunity* **3**, 87-89.

Brinchmann, J.E., Doblung, J.H., Heger, B.H., Haaheim, L.L., Sannes, M., Egeland, T. (1994). Expression of costimulatory molecule CD28 on T-cells in human immunodeficiency virus type 1 infection: functional and clinical correlations. *J. Inf. Dis.* **169**, 730-738.

Brown, W.C., Bissey, L., Logan, K.S., Pedersen, N.C., Elders, J.H., Collinson, E.W. (1991). Feline immunodeficiency virus infects both CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes. *J. of Virol.* **62**, 3359-3364.

Buck, C.A., (1992). Immunoglobulin Superfamily: structure function and relationship to other receptor molecules. *Semin. Cell Biol.* **3**, 179-188.

Buelens, C., Willems, F., Delvaux, A., Pierard, G., Delville, J.P., Velu, T., Goldman, M. (1995). Interleukin 10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2668-2675.

Caruso, A., Cantalamessa, A., Licenziati, S., Peroni, L., Prati, E., Martinelli, F., Canaris, A.D., Folghera, S., Gorla, R., Balsari, A. (1994). Expression of CD28 on CD8⁺ and CD4⁺ lymphocytes during HIV infection. *Scan. J. Immunol.* **40**, 485-490.

Cerdan, C., Martin, Y., Brailly, H., Courcoul, M., Flavetta, S., Costello, R., Mawas, C., Birg, F., Olive, D. (1991). IL-1 is produced by T lymphocytes activated via the CD2 plus CD28 pathways. *J. Immunol.* **146**, 560-564.

Chen, L., Linsley, P.S., Hellstrom, K.E. (1993). Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol. Today* **14**, 483-486.

Chesnut, R.W. a Grey, H.M. (1986). Antigen presentation by B cells and its significance in T-B interactions. *Adv. Immunol.* **39**, 51-59.

Clark, S.J., Saag M.S., Decker, W.D., Campbell, H.S., Roberson, J.L., Veldkamp, P.J. (1991). High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptoms of primary HIV-1 infection. *N. Eng. J. Med.* **324**, 954-960.

Clayberger, C., Lyu, S.C., DeKruyff, R., Parham, P., Krensky, A.M. (1994). Peptides corresponding to the CD8 and CD4 binding domains of HLA molecules block T-lymphocyte immune responses in vitro. *J Immunol.* **153**, 946-951.

Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T., Terhorst, C. (1988). The T-cell receptor-CD3 complex: A dynamic protein ensemble. *Annu. Rev. Immunol.* **6**, 629-662.

Connor, R.I., Mohri, H., Cao, Y., HO, D.D. (1993). Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+T- lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1 - infected individuals. *J. Virol.* **67**, 1772-1777.

Cooper, D.A., Tindall, B., Wilson, E.J., Imreie, A.A., Penny, R. (1988). Characterization of T-lymphocyte responses during primary infection with human immunodeficiency virus. *J. Inf. Dis.* **157**, 889-896.

Damle, N. K., Doyle, L.V., Grossmaire, L.S., Ledbetter, J.A. (1988). Differential regulatory signals delivered by antibody binding to the CD28 molecule during the activation of human T lymphocytes. *J. Immunol.* **140**, 1753-1761.

Damle, N.K., Klussman, K., Leytze, G., Myrdal, S., Arruffo, A., Ledbetter, J.A., Linsley, P.S. (1994). Costimulation of lymphocytes with integrin ligands ICAM-1 or VCAM-1 induces functional expression of CTLA-4 a second receptor for B7. *J. Immunol.* **152**, 2686-2697.

Davis, M.M. a Bjorkman, P.K. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* **334**, 395-402.

de Boer, M., Kasran, A., Kwekkeboom, J., Walter, H., Vandenberghe, P., Ceuppens, J.L. (1993). Ligation of B7 with CD28/CTLA-4 on T-cells results in CD40 ligand expression, interleukin-4 secretion and efficient help for antibody production by B cells. *Eur. J. Immunol.* **23**, 3120-3125.

- deWaal Malefyt, R., Yssel, H., de Vries, J.E. (1993). Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of Il-2 production and proliferation. *J. Immunol.* **150**, 4754-4765.
- Ding, L., Linsley, P.S., Huang, L.Y., Germain, R.N., Shevach, E.M. (1993). IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting upregulation of B7 expression. *J. Immunol.* **151**, 1224-1234.
- Driscoll, P.C., Cyster, J., Campbell, I., Williams, A. (1991). Structure of domain 1 of rat T-lymphocyte CD2 antigen. *Nature* **353**, 762-765.
- Ellis, J.H., Burden, M., Vinogradov, D., Linge, C., Crowe, J., (1996). Interactions of CD80 and CD86 with CD28 and CTLA-4. *J. Immunol.* **155**, 2700-2709.
- Englehard, V.H. (1994). Structure of peptides associated with MHC class I molecules. *Curr. Op. Immunol.* **6**, 13-21.
- English, R.V., Nelson, P., Johnson, C.M., Nasisse, M., Tompkins, W.A., Tompkins, M.B. (1994). Development of clinical disease in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *J. Inf. Dis.* **170**, 543-552.
- Fauci, A.S. and Dale, D.C. (1975). The effect of hydrocortisone on the kinetics of normal human lymphocytes. *Blood* **46**, 235-243.
- Fauci, A., Macher, A., Longo, D., Lane, H., Rook, A., Masur, H., Gelmann, E. (1984). Acquired immunodeficiency syndrome: epidemiological, clinical, immunological and therapeutic considerations. *Ann. Int. Med.* **100**, 92-106.

Fong, T.A. a Mosmann, T.R. (1990). Alloreactive murine CD8+ T-cell clones secrete the Th1 pattern of cytokines. *J. Immunol.* **144**, 1744-1752.

Fouchier, R.A., Meyaard, L., Brouwer, M., Hovenkamp, E., Schuitemaker, H. (1996). Broader tropism and higher cytopathicity for CD4⁺ T-cells of asyncytium-inducing compared to a non-syncytium-inducing HIV-1 isolate as a mechanism for accelerated CD4⁺ T cell decline in vivo. *Virology* **219**, 87-95.

Freedman, A.S., Freeman, G., Horowitz, J.C., Daley, J., Nadler, L.M. (1987). A B-cell restricted antigen that identifies preactivated B cells. *J. Immunol.* **139**, 3260-3267.

Freeman, G.J., Borriello, F., Hodes, R.J., Reiser, H., Hathcock, K.S., Laszlo, G., McKnight, A.J., Kim, J., Du, L., Lombard, D.B., Gray, G.S., Nadler, L.M., Sharpe, A.H. (1993). Uncovering a functional alternative CTLA-4 counter receptor in B7-1 deficient mice. *Science* **262**, 907-909.

Gajewski, T.F., Schell, S.R., Nau, G., Fitch, F.W. (1989). Regulation of T-cell activation: Differences among T-cell subsets. *Immunol. Rev.* **111**, 79-110.

Germain, R.N. (1993). The Biochemistry and cell Biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 403-450.

Haffar, O.K., Smithgall, M.D., Bradshaw, J., Brady, W., Damle, N.K., Linsley, P.S. (1993). Costimulation of T-cell activation and virus production by B7 antigen on activated CD4⁺ T-cells from human immunodeficiency virus type 1 - infected donors. *Immunology* **90**, 11094-11098.

Harlan, D.M., Abe, R., Lee, K.P., June, C.H. (1995). Potential roles of the B7 and CD28 receptor families in autoimmunity and immune evasion. *Clin. Immunol. Immunopath.* **75**, 77-111.

Hodge, J.W., Abrami, S., Schlom, J., Kantor, J.A. (1994). Induction of antitumor immunity by recombinant vaccinia viruses expressing B7-1 or B7-2 costimulatory molecules. *Can. Res.* **54**, 5552-5555.

Hutchcroft, J.E. a Bierer, B.E. (1996). Signaling through CD28/CTLA-4 family receptors. *J. Immunol.* **155**, 4071-4074.

Jenkins, M.K., Pardoll, D.M., Mizuguchi, J., Quill, H., Schwartz, R.H. (1987). T cell responsiveness in vivo and in vitro: Fine specificity of induction and molecular characterization of the unresponsive state. *Immunol. Rev.* **95**, 113-135.

June, C.H., Ledbetter, J.H., Linsley, P.S., Thompson, C.B. (1990). Role of the CD28 molecule in T-cell activation. *Immunol. Today* **11**, 211-216.

June, C.H., Bluestone, J.A., Nadler, L.M., Thompson, C.B. (1994). The B7 and CD28 receptor families. *Immunol. Today* **12**, 321-333.

Kozber, D., Moretta, A., Messner, H.A., Moretta, L., Croce, C.M. (1987). Tp44 molecules involved in antigen-independant T cell activation are expressed on human plasma cells. *J. Immunol.* **138**, 4128-4132.

Kupfer, A. a Singer, S.J. (1989). Cell biology of cytotoxic and helper T-cell functions. *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 309-337.

Landay, A.L., Mackewicz, C.E., Levy, J.A. (1993). An activated CD8+ T cell phenotype coorelates with an anti-HIV activity and assymptomatic clinical status. *Clin Immun. Immunopath.* **69**, 106-116.

Lane, P., Burdet, C., Hubele, S., Scheidegger, D., Muller; U., Mc Connell, F., Kosco-Vilbois, M. (1994). B cell function in mice transgenic for mCTLA4-H gamma 1: lack of germinal centers correlated with poor affinity maturation and class switching despite normal priming of CD4+ T-cells. *J Exp Med.* **179**, 819-830.

Lanier, L.L., O'Fallon, S., Somoza, C., Phillips, J.H., Linsley, P.S., Okumura, K., Ito, D., Azuma, M. (1995). CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J. Immunol.* **154**, 97-105.

Larsen, C.P., Ritchie, S.C., Pearson, T.C., Linsley, P.S., Lowry, R.P. (1992). Functional expression of the costimulatory molecule B7/BB1 in murine dendritic cell populations. *J.Exp. Med.* **176**, 1215-1220.

Leahy, D., Axel, R., Hendrickson, W. (1992). Crystal structure of a soluble form of human T cell counter receptor CD8 at 2.8 resolution. *Cell* **68**, 1145-1162.

Lechler, R.I., Lombardi, G., Batchelor J.R., Reinsmoen N., Bach, F.H. (1990). The molecular basis of alloreactivity. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 83-88.

Lenschow, D.J., Substituovan, G.H-T., Zuckermann, L.A., Nabavi, N., Jellis, C.L., Gray, G.S., Miller, J., Bluestone, J.A. (1993). Expression and functional

significance of an additional ligand for CTLA-4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 11054-11058.

Lenschow D.J., Walunas, T.L., Bluestone, J.A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 233-258.

Leung, H.T. a Linsley, P.S. (1994) The CD28 costimulatory pathway. *Therap. Immunol.* **1**, 217-228.

Lewis, D.E., Ng Tang, D.S., Adu-Oppong, A., Schober, W., Rodgers, J. (1994). Anergy and apoptosis in CD8+ T-cells from HIV infected persons. *J. Immunol.* **153**, 412-420.

Li, Y., McGowan, P., Hellstrom, I., Hellstrom, K.E., Chen, L. (1994). Costimulation of tumor reactive CD4 and CD8 T-lymphocytes by B7 a natural ligand for CD28 can be used to treat established mouse melanoma. *J. Immunol.* **153**, 421-428.

Lindsten, T., Lee, K.P., Harris, E.S., Petryniak, B., Craighead, N., Reynolds, P.J., Lombard, B.D., Freeman, G.J., Nadler, L.M., Gray, G.S. (1993). Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T-cells. *J. Immunol.* **151**, 3489-3499.

Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L.S., Damle, N.K., Ledbetter, J.A. (1991a). Binding of the B-cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T-cell proliferation and Interleukin-2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* **173**, 721-730.

Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L.S., Damle, N.K., Ledbetter, J.A., (1991b). CTLA-4 is a second receptor for the B-cell activation antigen B7. *J. Exp. Med.* **174**, 5561-569.

Linsley, P.S., Wallace, P.M., Johnson, J., Gipson, M.G., Greene, J.L., Ledbetter, J.A., Singh, C., Tepper, M.A. (1992a). Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* **257**, 792-795.

Linsley, P.S., Greene, J.L., Tan, P., Bradshaw, J., Ledbetter, J.A., Anasetti, C., Damle, N.K. (1992b). Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* **176**, 1595-1604.

Linsley, P.S. and Ledbetter, J.A. (1993a). The role of CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Ann. Rev. Immunol.* **11**, 191-212.

Linsley, P.S., Bradshaw, J., Urnes, M., Grosmaire, L., Thompson, C.B. (1993b). CD28 engagement by B7/BB-1 induces transient down-regulation of CD28 synthesis and prolonged unresponsiveness to CD28 signaling. *J. Immunol.* **150**, 3161-3169.

Linsley, P.S., Greene, J.L., Brady, W., Bajorath, J., Ledbetter, J.A., Peach, R. (1994a). Human B7-1 (CD80) and B-7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* **1**, 793-801.

Linsley, P.S., Peach, R., Gladstone, P., Bajorath, J. (1994b). Extending the B7(CD80) gene family. *Prot. Sci.* **3**, 1341-1343.

Linsley, P.S., Ledbetter, J., Peach, R., Bajorath, J. (1995a). CD28/CTLA-4 receptor structure, binding stoichiometry and aggregation during T cell activation. *Res. Immunol.* **146**, 130-140.

Linsley, P.S., Nadler, S.G., Bajorath, J., Peach, R., Leung, H.T., Rogers, J., Bradshaw, J., Stebbins, M.,

Leytze, G., Brady, M., Malacko, A.R., Marquardt, H., Shaw, S. (1995b). Binding stoichiometry of the cytotoxic T-lymphocyte-associated molecule-4 (CTLA-4). *J. Biol. Chem.* **270**, 15417-15424.

Littman, D.R. (1987). The structure of the CD4 and CD8 genes. *Annu. Rev. Immunol.* **5**, 561-584.

Liu, C.C., Welsh, C.M., Young, J. D-E (1995). Perforin: Structure and function. *Immunol. Today* **16**, 194-201.

Liu, Y., Jones, B., Brady, W., Janeway, C.A., Linsley, P. (1992). Murine CD4 T cell growth: B7 and heat stable antigen both participate in co-stimulation. *Eur. J. Immunol.* **115**, 1905-1912.

Lombardi, S., Garzelli, C., Pistello, M., Massi, C., Matteucci, D., Baldinotti, F., Cammarota, G., Da Prato, L., Bandecchi, P., Tozzini, F., Bendinelli, M. (1994). A neutralizing antibody-inducing peptide of the V3 domain of feline immunodeficiency virus envelope glycoprotein does not induce protective immunity. *J. Virol.* **68**, 8374-8379.

Lu, Y., Granelli-Piperno, A., Bjorndahl, J.M., Phillips, C.A., Trevillyan, J.M. (1992). CD28-induced T cell activation. Evidence for a protein-tyrosine kinase signal transduction pathway. *J. Immunol.* **149**, 24-29.

Luria, S.E. a Darnell, J.E. (1968). „General Virology.“ New York: John Willey and Sons, Inc.

Lwoff, A. (1957). The concept of virus. *J. Gen. Microbiol.* **17**, 239-253.

- Maniatis, T., Fritsch, E.F. a Sambrook, J. (1982). „Molecular Cloning: A Laboratory Manual.“ New York: Cold Spring Harbor Press.
- Martin, P.J., Ledbetter, J.A., Morishita, Y., June, C.H., Beatty, P.J., Hansen, J.A. (1986). A 44 kilodalton cell surface homodimer regulates interleukin 2 production by activated human T lymphocytes. *J. Immunol.* **136**, 3282-3287.
- Matasumura, M., Fremont, D.H., Peterson, P.A., Wilson, I.A. (1992). Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* **257**, 927-934.
- Mescher, M.F. (1992). Surface contact requirements for activation of cytotoxic T-lymphocytes. *J. Immunol.* **49**, 2402-2405.
- Minty, A., Chalon, P., Derocq, J.M., Dumont, X., Guillemont, J.C., Kaghad, M., Labit, C., Leplatois, P., Liauzun, P., Miloux, B., Minty, C., Casellas, P., Loison, G., Lupker, J., Shire, D., Ferrara, P., Caput, D. (1993). Interleukin 13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature* **362**, 248-250.
- Moffet, C.W. a Paden, C.M. (1994). Microglia in the rat neurohypophysis increase expression of class I major histocompatibility antigens following central nervous system injury. *J Neuroimmunol.* **50**, 139-51.
- Mosmann, T. and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 145-173.
- Nabavi, N., Freeman, G.J., Gault, D., Gotfrey, G.N., Nalder, L.M., Glimcher, L.M. (1992). Signaling through the

MHC CII cytoplasmic domain is required for antigen presentation and induces B7 expression. *Nature* **360**, 266-268.

Nagata, S. a Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* **267**, 1449-1465.

Nickoloff, B.J., Mitra, R.S., Lee, K., Turka, L.A., Greem, J., Thompson, C., Shimizu, Y. (1993). Discordant expression of CD28 ligands BB-1 and B7 on keratinocytes in vitro and psoriatic cells in vivo. *Am J. Path.* **142**, 1029-1040.

Novotney, C., English, R., Housman, J., Davidson, M., Nasisse, M., Jeng, C.R. (1990). Lymphocyte population changes in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *AIDS* **4**, 1213-1218.

O'Doherty, U., Steinman, R.M., Peng, M., Cameron, P.U., Gezelter, S., Kopeloff, I., Swiggard, W.J., Pope, M., Bhardwaj, N. (1993). Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned media. *J. Exp. Med.* **178**, 1067-1076.

Ozawa, H., Aiba, S., Nakagawa, S., Tagami, H. (1995). Interferon gamma and interleukin 10 inhibit antigen presentation by Langerhan's cells for T helper type 1 cells by suppressing their CD80 (B7-1) expression. *Eur. J. Immunol.* **26**, 648-652.

Page, C., Thompson, C., Yacoub, M., Rose, M. (1994). Human endothelial stimulation of allogenic T-cells via a CTLA-4 independant pathway. *Trans. Immunol.* **2**, 342-347.

Peach R., Bajorath, J., Brady, W., Leytze, G., Greene, J., Naemura, J., Linsley, P.S. (1994). CDR1 and CDR3-analogous

regions in CTLA-4 and CD28 determine the binding to B7-1. *J. Exp. Med.* **180**, 2049-2058.

Peach, R., Bajorath, J., Naemura, J., Leytze, G., Greene, J., Aruffo, A., Linsley, P.S. (1995). Both extracellular immunoglobulin-like domain of CD80 contain residues critical for binding T-cell surface receptors CTLA-4 and CD28. *J. Biol. Chem.* **270**, 21181-21187.

Pedersen, N.C., Ho, E., Brown, M.L., Yamamoto, J.K. (1987). Isolation of a t lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency like syndrome. *Science* **235**, 790-793.

Prasad, K.V., Cai Y.C., Raab, M., Duckworth, B., Cantley, L., Shoelson, S.E., Rudd, C.E. (1994). T-cell antigen CD28 interacts with the lipid kinase phosphatidylinositol3-kinase by a cytoplasmic Tyr(P)-Met-Xaa-Met motif. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**, 2834-2838.

Radvanyi, L.G., Shi, Y., Vaziri, H., Sharma, A., Dhala, R., Mills, G.B., Miller, R.G. (1996). CD28 costimulation inhibits TSR-induced apoptosis during a primary T cell response. *J. Immunol.* **158**, 1788-1798.

Ranheim, E.A. and Kipps, T.J. (1995). Tumor necrosis factor-alpha facilitates induction of CD80 (B7-1) on human B cells by activated T-cells: complex regulation by IL-4, Il-10, and CD40L. *Cell. Immunol.* **161**, 226-235.

Razi-Wolf, Z., Freeman, G., Galvin, F., Benacerraf, B., Nadler, L., Reiser, H. (1992). Expression and function of the murine B7 antigen and the major costimulatory molecule expressed by peritoneal exudate cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **89**, 4210-4214.

- Ronchese, F., Hausmann, B., Hubele, S., Lane, P. (1994). Mice transgenic for a soluble form of murine CTLA-4 show enhanced expansion of antigen-specific CD4⁺ T-cells and defective antibody production in vivo. *J. Exp. Med.* **179**, 809-817.
- Rotzschke, O. a Falk, K. (1994). Origin structure and motifs of naturally processed MHC class II ligands. *Curr. Op Immunol.* **6**, 45-51.
- Russel, J.H. (1983). Internal disintegration model of cytotoxic lymphocyte induced target damage. *Immunol. Rev.* **72**, 97-118.
- Saukkonen, J.J., Kornfield, H., Berman, J.S. (1993). Expansion of a CD8⁺CD28⁺ cell population in the blood and lung of HIV- positive patients. *JAIDS* **11**, 1194-1199.
- Schattner, E. and Laurence, J. (1994). HIV induced T-lymphocyte depletion. *Clin. Lab. Med.* **14**, 221-227.
- Schmittel, A., Scheigenbogen, C., Keilholz, U. (1995). Lipopolysaccharide effectively up-regulates B7-1 (CD80) expression and costimulatory function of human monocytes. *Scan. J. Immunol.* **42**, 701-704.
- Schwartz, R.H. (1992). Costimulation of T-lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4 and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* **71**, 1065-1068.
- Seder, R.A., Germain, R.N., Linsley, P.S., Paul, W.E. (1994). CD28 mediated co-stimulation of IL-2 production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and INF γ production, *J. Exp Med.* **179**, 299-304.

Shahinian, A., Pfeffer, K., Lee, K.P., Kundig, T.M., Kishihara, K., Wakeham, A., Kawai, K., Ohashi, P.S., Thompson, C.B., Mak, T.B. (1993). Differential T cell costimulatory requirements in CD28 deficient mice. *Science* **261**, 609-612.

Sher, A., Gazzinelli, R.T., Oswald, I.P., Clerici, M., Kullberg, M., Pearce, E.J., Berzofsky, J.A., Mosmann, T.R., James, S.L., Morse, H.C. (1992). Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol Rev.* **127**, 183-204.

Siebelink, K.H., Chu, I.H., Rimmelzwaan, G.F., Weijer, K., van Herwijnen, H.R., Knell, P. (1990). Feline Immunodeficiency virus (FIV) infection in the cat as a model for HIV infection in man: FIV induced impairment of immune function. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **6**, 1373-1378.

Siebelink, K.H., Tijhaar, E., Huisman, R.C., Huisman, W., deRonde, A., Darby, I.H., Francis, M.J., Rimmelzwaan, G.F., Osterhaus, A.D. (1995). Enhancement of feline immunodeficiency virus infection after immunization with envelope glycoprotein subunit vaccines. *J virol.* **69**, 3704-3711.

Singer, S.J. (1992). Intracellular communication and cell:cell adhesion. *Science* **255**, 1671-1674.

Smithgall, M.D., Wong, J.G., Linslley, P.S., Haffar, O.K. (1995). Costimulation of CD4+ T-cells via CD28 modulates human immunodeficiency type 1 infection and replication in vitro. *AIDS Res. Hu. Retro.* **11**, 855-892.

Springer, T.A., Dustin, M.L., Kishimoto, T.K., Marlin, S.D. (1987). The lymphocyte function associated LFA-1, CD2 and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **5**, 223-252.

Springer, T.A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**, 425-434.

Stack, R.M., Lenschow, D.J., Gray, G.S., Bluestone, J.A., Fitch, F.W. (1994). IL-4 treatment of small splenic B cells induces co-stimulatory molecules B7-1 and B7-2. *J. Immunol.* **152**, 5723-5733.

Symington, F.W., Brady, W., Linsley, P.S. (1993). Expression and function of B7 on human epidermal Langerhan's cells. *J. Immunol.* **150**, 1286-1295.

Taylor, M.K. a Kohen, J.J. (1992). Cell mediated cytotoxicity. *Curr. Opin. Immunol.* **4**, 338-343.

Thomas, R., Davi, L.S., Lipsky, P.E. (1994). Rheumatoid synovium is enriched in mature antigen presenting dendritic cells. *J. Immunol.* **152**, 2613-2623.

Townsend, S.E. a Allison, J.P. (1993). Tumor rejection after direct costimulation of CD8⁺ T-cells by B7 transfected melanoma cells. *Science* **259**, 368-370.

Turka, L.A., Ledbetter, J.A., Lee, K., June, C.H., Thompson, C.B. (1990). CD28 is an inducible T cell surface antigen that transduces a proliferative signal in CD3⁺ mature thymocytes. *J. Immunol.* **144**, 1646-1653.

Turka, L.A., Linsley, P.S., Paine, R., Schieven, G.L., Thompson, C.B., Ledbetter, J.A. (1991). Signal transduction

via CD4, CD8 and CD28 in mature and immature thymocytes. *J. Immunol.* **146**, 1428-1436.

Unanue, E.R. (1984). Antigen presenting function of the macrophage. *Annu. Rev. Immunol.* **2**, 395-428.

van Kooten, C., Rensink, I., Pascual, -Salcedo, D., van Oers, R., Aarden, L. (1991). Monokine production by human T-cells: IL-1 alpha production is limited to memory T-cells. *J. Immunol.* **146**, 2654-2658.

van Seventer, G.A., Shimizu, ., Shaw, S. (1991). Roles of multiple accessory molecules in T cell activation. *Curr. Opin Immunol.* **3**, 294-303.

Wang, R., Murphy, K.M., Loh, D.Y., Weaver, C., Russell, J.H. (1993). Differential activation of antigen-stimulated suicide and cytokine production pathways in CD4+ T-cells is regulated by the antigen-presenting cell. *J Immunol.* **150**, 3832-42.

Weiss, A. a Littman, D.R. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**, 263-274.

Williams, A. a Barclay, A. (1988). The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recogniton. *Ann. Rev. Immunol.* **6**, 381-405.

Windhagen, A., Newcombe, J., Dangond, F., Strand, C., Woodroofe, M.N., Cozner, M.L., Hafler, D.A. (1995). Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) and interleukin 12 in multiple schlerosis lesions. *J. Exp. Med.* **182**, 1985-1996.

Yamamoto, J.K., Hansen, H., Ho, W.E., Morishita, T.Y., Okuda, T., Sawa, T.R. (1989). Epidemiological and clinical

aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. *J.A.V.M.A.* **194**, 213-220.

Yasukawa, M., Inatsuki, A., Kobayashi, Y. (1989). Differential in vitro activation of CD4+CD8- and CD8+CD4- herpes simplex virus-specific human cytotoxic T-cells. *J. Immunol.* **143**, 2051-2057.

Yssel, H., Schneider, P.V., Lanier, L.L. (1993). Interleukin 7 specifically induces B7/BB1 antigen on human cord blood and peripheral blood T-Cells and T cell clones. *Immunol.* **5**, 753-759.

Zanussi, S., Simonelli, C., D'Andrea, M., Caffau, C., Cillerici, M., Tirelli, U., DePaoli, P (1996). CD8⁺ lymphocyte phenotype and cytokine production in long-term non-progressor and in progressor patients with HIV-1 infection. *Clin Exp. Immunol.* **105**, 220-224.

Zhou, T., Weaver, C., Linsley, P.S., Mountz, J.D. (1994). T-cells of staphylococcal enterotoxin B-tolerized autoimmune MLR- lpr/lpr mice require costimulation through the B7- CD28/CTLA-4 pathway for activation and can be reenergized in vivo by stimulation of the T cell receptor in the absence of costimulatory signal. *Eur. J. Immunol.* **24**, 1019-1025.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Izolovaná nukleová kyselina kódující kočičí ligand CD80 nebo kočičí rozpustný ligand CD80.

2. Izolovaná nukleová kyselina kódující kočičí ligand CD86 nebo kočičí rozpustný ligand CD86.

3. Izolovaná nukleová kyselina kódující kočičí receptor CD28 nebo kočičí rozpustný receptor CD28.

4. Izolovaná nukleová kyselina kódující kočičí receptor CTLA-4 nebo kočičí rozpustný receptor CTLA-4.

5. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 1, ve které má kočičí ligand CD80 sekvenci znázorněnou na obr. 1A začínající methioninem a končící threoninem (sekvence ID NO:1).

6. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 2, ve které má kočičí ligand CD86 sekvenci znázorněnou na obr. 3A začínající methioninem a končící isoleucinem (sekvence ID NO:5).

7. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 3, ve které má kočičí receptor CD28 sekvenci znázorněnou na obr. 4A začínající methioninem a končící serinem (sekvence ID NO:7).

8. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 4, ve které má kočičí receptor CTLA-4 sekvenci znázorněnou na obr. 5A začínající methioninem a končící asparaginem (sekvence ID NO:9).

9. Izolovaná nukleová kyselina podle některého z nároků 1 až 4, ve které je nukleovou kyselinou DNA nebo RNA.

10. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 9, ve které je DNA cDNA nebo genomová DNA.

11. Oligonukleotid tvořený alespoň 12 nukleotidy, který má sekvenci komplementární k sekvenci unikátně přítomné v nukleové kyselině podle některého z nároků 1 až 4.

12. Oligonukleotid podle nároku 11, jehož délku tvoří alespoň 15 nebo 16 nukleotidů.

13. Oligonukleotid podle nároku 11 nebo 12, který je detekovatelně značený.

14. Oligonukleotid podle nároku 13, jehož detekovatelné značení obsahuje radioizotop, fluorofor nebo biotin.

15. Oligonukleotid podle nároku 11 nebo 12, který se selektivně methylován.

16. Vektor obsahující nukleovou kyselinu podle nároku 1.

17. Plasmidový vektor podle nároku 16 označený jako PSI-B7-1/871-35 (ATCC přístupové číslo 209817).

18. Vektor obsahující nukleovou kyselinu podle nároku 2.

19. Plasmidový vektor podle nároku 18 označený jako B7-2#19-2/011298 (ATCC přístupové číslo 209821).

20. Vektor obsahující nukleovou kyselinu podle nároku 3.

21. Plasmidový vektor podle nároku 20 označený jako PSI-CD28 #7/100296 (ATCC přístupové číslo 209819).

22. Vektor obsahující nukleovou kyselinu podle nároku 4.

23. Plasmidový vektor podle nároku 22 označený jako CTLA-4#1/091997 (ATCC přístupové číslo 209820).

24. Vektor podle některého z nároků 16 až 23, který obsahuje promotor operativně navázaný na nukleovou kyselinu.

25. Hostitelská buňka, která obsahuje vektor podle některého z nároků 16 až 24.

26. Hostitelská buňka podle nároku 25, která je eukaryotickou nebo prokaryotickou buňkou.

27. Hostitelská buňka podle nároku 26, která se zvolí ze skupiny sestávající z *E.coli*, kvasinek, COS buněk, PC12 buněk, CHO buněk a GH4C1 buněk.

28. Polypeptid kódovaný nukleovou kyselinou podle nároku 1.

29. Polypeptid kódovaný nukleovou kyselinou podle nároku 2.

30. Polypeptid kódovaný nukleovou kyselinou podle nároku 3.

31. Polypeptid kódovaný nukleovou kyselinou podle nároku 4.

32. Způsob výroby polypeptidu podle některého z nároků 28 až 31, v y z n a č e n ý t í m, že zahrnuje kultivaci hostitelské buňky, která exprimuje polypeptid, a izolaci takto vyprodukovaného polypeptidu.

33. Vakcína v y z n a č e n á t í m, že obsahuje účinné množství polypeptidu podle některého z nároků 28 až 30 a vhodný nosič.

34. vakcína podle nároku 33 v y z n a č e n á t í m, že účinným množstvím je přibližně 0,01 mg až 100 mg na dávku.

35. Vakcína podle nároku 33 v y z n a č e n á t í m, že účinným množstvím je přibližně 0,25 mg/kg tělesné hmotnosti kočky/den až přibližně 25 mg/kg tělesné hmotnosti kočky/den.

36. Vakcína podle nároku 33 až 35, v y z n a č e n á t í m, že dále obsahuje imunogen odvozený z patogenu.

37. Vakcína podle nároku 36, v y z n a č e n á t í m, že patogenem je kočičí patogen, virus vztekliny, patogen Chlamydia, patogen Toxoplasmosis gondii, patogen Dirofilaria immitis, bleší patogen nebo bakteriální patogen.

38. Vakcína podle nároku 37 v y z n a č e n á t í m, že kočičím patogenem je virus kočičí imunodeficiency (FIV), virus kočičí leukémie (FeLV), virus kočičí infekční peritonitidy (FIP), virus kočičí panleukopenie, kočičí kalikivirus, kočičí reovirus typu 3, kočičí rotavirus, kočičí koronavirus, kočičí syncytiální virus, kočičí sarkomavirus, kočičí herpesvirus, kočičí virus Bornovy choroby nebo kočičí parazit.

39. Způsob indukce imunity u kočky v y z n a č e n ý t í m, že zahrnuje podání dávky vakcíny podle některého z nároků 36 až 38 kočce.

40. Způsob zesílení imunitní odezvy u kočky v y z n a č e n ý t í m, že zahrnuje podání dávky vakcíny podle z některého z nároků 33 až 38 kočce.

41. Způsob podle nároku 39 nebo 40 v y z n a č e n ý t í m, že se vakcína podává subkutánně, intramuskulárně, systemicky, topicky nebo orálně.

42. Způsob potlačení imunitní odezvy u kočky v y z n a č e n ý t í m, že zahrnuje podání účinně imunitní odezvu potlačujícího množství polypeptidu podle nároku 31 kočce.

43. Způsob potlačení imunitní odezvy u kočky v y z n a č e n ý t í m, že zahrnuje podání účinně imunitní odezvu potlačujícího množství rozpustného polypeptidu podle nároků 28 až 30 kočce.

44. Způsob podle nároku 42 nebo 43 v y z n a č e n ý t í m, že množstvím je přibližně 0,25 mg/kg tělesné hmotnosti/den až 25 mg/kg tělesné hmotnosti/den.

45. Způsob podle nároku 42 nebo 43 v y z n a č e n ý t í m, že kočka trpí autoimunitním onemocněním nebo je příjemcem tkáňového nebo orgánového transplantátu.

Zastupuje:

1/13

Obr. 1A-1

FeB71.TAMU

ATGGGTCACGCAGCAAAGTGGAAAACACCACTACTGAAGCACCCATATCCCAAGCTCTTT 60
 Met Gly His Ala Ala Lys Trp Lys Thr Pro Leu Leu Lys His Pro Tyr Pro Lys Leu Phe

CCGCTCTTGATGCTAGCTAGTCTTTTTTACTTCTGTTTCAGGTATCATCCAGGTGAACAAG 120
 Pro Leu Leu Met Leu Ala Ser Leu Phe Tyr Phe Cys Ser Gly Ile Ile Gln Val Asn Lys

ACAGTGGAAGAAGTAGCAGTACTATCCTGTGATTACAACATTTCCACCAAAGAACTGACG 180
 Thr Val Glu Glu Val Ala Val Leu Ser Cys Asp Tyr Asn Ile Ser Thr Lys Glu Leu Thr

GAAATTCGAATCTATTGGCAAAGGATGATGAAATGGTGTGGCTGTCATGTCTGGCAA 240
 Glu Ile Arg Ile Tyr Trp Gln Lys Asp Asp Glu Met Val Leu Ala Val Met Ser Gly Lys

GTACAAGTGTGGCCCAAGTACAAGAACCGCACATTCACTGACGTCACCGATAACCACTCC 300
 Val Gln Val Trp Pro Lys Tyr Lys Asn Arg Thr Phe Thr Asp Val Thr Asp Asn His Ser

ATTGTGATCATGGCTCTGCGCCTGTCAGACAATGGCAAATACACTTGTATTATTCAAAAG 360
 Ile Val Ile Met Ala Leu Arg Leu Ser Asp Asn Gly Lys Tyr Thr Cys Ile Ile Gln Lys

ATTGAAAAAGGGTCTTACAAAGTGAACACCTGACTTCGGTGATGTTATTGGTCAGAGCT 420
 Ile Glu Lys Gly Ser Tyr Lys Val Lys His Leu Thr Ser Val Met Leu Leu Val Arg Ala

GACTTCCTGTCCCTAGTATAACTGATCTTGGAAATCCATCTCATAACATCAAAGGATA 480
 Asp Phe Pro Val Pro Ser Ile Thr Asp Leu Gly Asn Pro Ser His Asn Ile Lys Arg Ile

ATGTGCTTAACTTCTGGAGGTTTTCCAAAGCCTCACCTCTCCTGGCTGGAAAATGAAGAA 540
 Met Cys Leu Thr Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn Glu Glu

GAATTAATGCCATCAACACAACAGTTTTCCCAAGATCCTGAAACTGAGCTCTACACTATT 600
 Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Thr Ile

AGCAGTGAAGTGGATTTCAATATGACAAACAACCATAGCTTCCTGTGTCTTGTCAGGTAT 660
 Ser Ser Glu Leu Asp Phe Asn Met Thr Asn Asn His Ser Phe Leu Cys Leu Val Lys Tyr

Obr. 1A-2

GGAAACTTACTAGTATCACAGATCTTCAACTGGCAAAAATCAGAGCCACAGCCTTCTAAT 720
Gly Asn Leu Leu Val Ser Gln Ile Phe Asn Trp Gln Lys Ser Glu Pro Gln Pro Ser Asn

AATCAGCTCTGGATCATTATCCTGAGCTCAGTAGTAAGTGGGATTGTTGTGATCACTGCA 780
Asn Gln Leu Trp Ile Ile Ile Leu Ser Ser Val Val Ser Gly Ile Val Val Ile Thr Ala

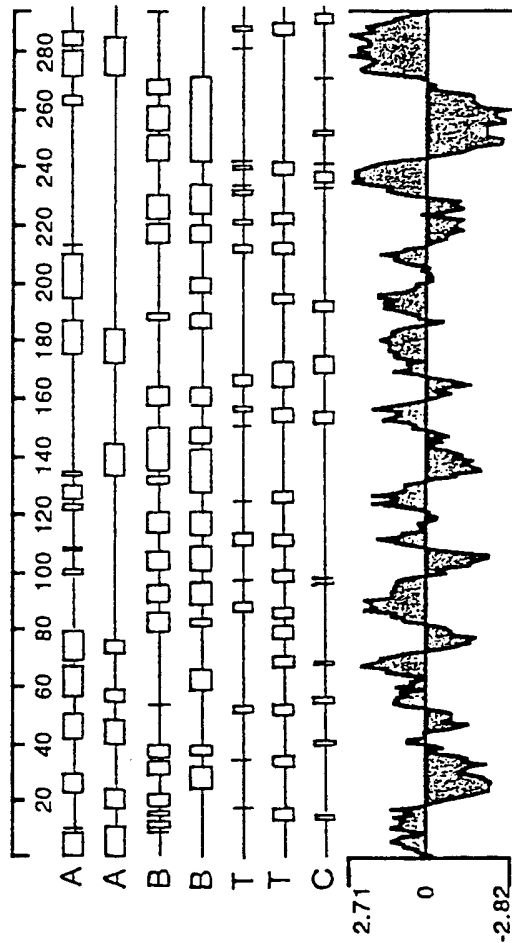
CTTACCTTAAGATGCCTAGTCCACAGACCTGCTGCAAGGTGGAGACAAAGAGAAATGGGG 840
Leu Thr Leu Arg Cys Leu Val His Arg Pro Ala Ala Arg Trp Arg Gln Arg Glu Met Gly

AGAGCGCGGAAATGGAAAAGATCTCACCTGTCTACATAGATTCTGCAGAACCACTGTATG 900
Arg Ala Arg Lys Trp Lys Arg Ser His Leu Ser Thr

CAGAGCATCTGGAGGTAGCCTCTTTAGCTCTTCTCTACTAG 941

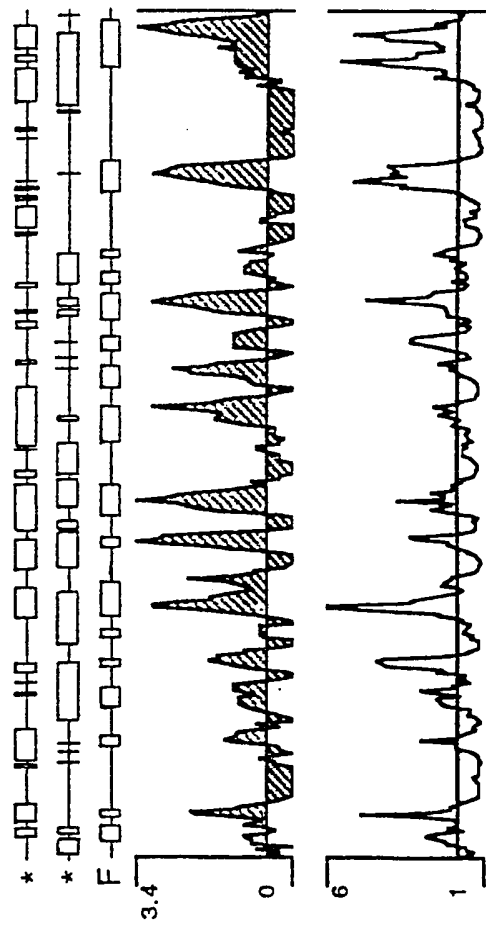
Obr. 1B

Graf hydrofobicity: Kočičí CD80 (B7-1)



- Alfa, oblastí - Garnier-Robson
- Alfa, oblastí - Chou-Fasman
- Beta, oblastí - Garnier-Robson
- Beta, oblastí - Chou-Fasman
- Otáčka, oblastí - Garnier-Robson
- Otáčka, oblastí - Chou-Fasman
- Helix, oblastí - Garnier-Robson

Graf hydrofility - Kyte-Doolittle



- Alfa, amfipatické oblastí - Eisenberg
- Beta, amfipatické oblastí - Eisenberg
- Flexibilní oblastí - Karplus-Schulz

Antigenní index - Jameson-Wolf

Graf povrchové pravděpodobnosti - Emini

Kočičí B7-1 ORF

Feline B7-1 (CD80)

4/13

Obr. 2A-1

FeB71-SYNTRO

ATGGGTCACGCAGCAAAGTGGAAAACACCACTACTGAAGCACCCATATCCCAAGCTCTTT 60
 Met Gly His Ala Ala Lys Trp Lys Thr Pro Leu Leu Lys His Pro Tyr Pro Lys Leu Phe

CCGCTCTTGATGCTAGCTAGTCTTTTTTACTTCTGTTTCAGGTATCATCCAGGTGAACAAG 120
 Pro Leu Leu Met Leu Ala Ser Leu Phe Tyr Phe Cys Ser Gly Ile Ile Gln Val Asn Lys

ACAGTGAAGAAGTAGCAGTACTATCCTGTGATTACAACATTTCCACCAAAGAACTGACG 180
 Thr Val Glu Glu Val Ala Val Leu Ser Cys Asp Tyr Asn Ile Ser Thr Lys Glu Leu Thr

GAAATTCGAATCTATTGGCAAAGGATGATGAAATGGTGTGGCTGTCATGTCTGGCAA 240
 Glu Ile Arg Ile Tyr Trp Gln Lys Asp Asp Glu Met Val Leu Ala Val Met Ser Gly Lys

GTACAAGTGTGGCCCAAGTACAAGAACCGCACATTCCTGACGTCACCGATAACCACTCC 300
 Val Gln Val Trp Pro Lys Tyr Lys Asn Arg Thr Phe Thr Asp Val Thr Asp Asn His Ser

ATTGTGATCATGGCTCTGCGCCTGTCAGACAATGGCAAATACACTTGTATCATTCAAAG 360
 Ile Val Ile Met Ala Leu Arg Leu Ser Asp Asn Gly Lys Tyr Thr Cys Ile Ile Gln Lys

ATTGAAAAAGGGTCTTACAAAGTGAACACCTGACTTCGGTGATGTTATTGGTCAGAGCT 420
 Ile Glu Lys Gly Ser Tyr Lys Val Lys His Leu Thr Ser Val Met Leu Leu Val Arg Ala

GACTTCCCTGTCCTTAGTATAACTGATCTTGGAAATCCATCTCATAACATCAAAGGATA 480
 Asp Phe Pro Val Pro Ser Ile Thr Asp Leu Gly Asn Pro Ser His Asn Ile Lys Arg Ile

ATGTGCTTAACTTCTGGAGGTTTTCCAAAGCCTCACCTCTCCTGGCTGGAAAATGAAGAA 540
 Met Cys Leu Thr Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn Glu Glu

GAATTAATGCCATCAACACAACAGTTTTCCCAAGATCCTGAAACTGAGCTCTACACTATT 600
 Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Thr Ile

AGCAGTGAAGTGGATTTCAATATGACAAACAACCATAGCTTCTGTGTCTTGTCAAGTAT 660
 Ser Ser Glu Leu Asp Phe Asn Met Thr Asn Asn His Ser Phe Leu Cys Leu Val Lys Tyr

05.10.01

01-3116-00-Če

5/13

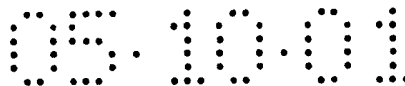
Obr. 2A-2

GGAACTTAATAGTATCACAGATCTTCAACTGGCAAAAATCAGAGCCACAGCCTTCTAAT 720
Gly Asn Leu Ile Val Ser Gln Ile Phe Asn Trp Gln Lys Ser Glu Pro Gln Pro Ser Asn

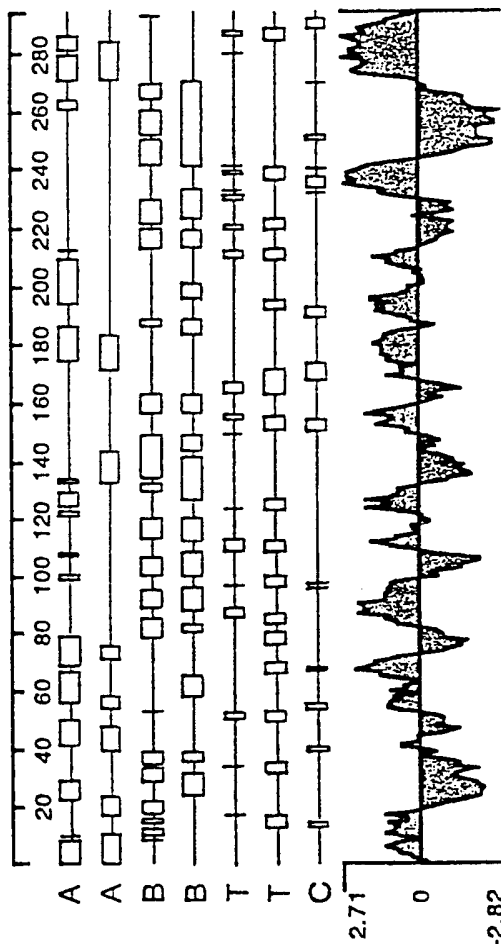
AATCAGCTCTGGATCATTATCCTGAGCTCAGTAGTAAGTGGGATTGTTGTGATCACTGCA 780
Asn Gln Leu Trp Ile Ile Ile Leu Ser Ser Val Val Ser Gly Ile Val Val Ile Thr Ala

CTTACCTTAAGATGCCTAGTCCACAGACCTGCTGCAAGGTGGAGACAAAGAGAAATGGGG 840
Leu Thr Leu Arg Cys Leu Val His Arg Pro Ala Ala Arg Trp Arg Gln Arg Glu Met Gly

AGAGCGCGGAAATGGAAAAGATCTCACCTGTCTACATAG 879
Arg Ala Arg Lys Trp Lys Arg Ser His Leu Ser Thr

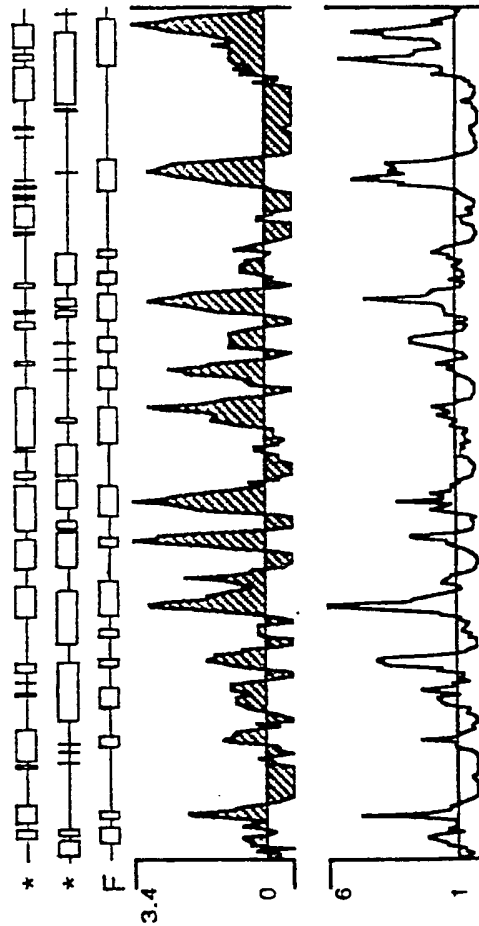


Graf hydrofobicity: Kočičí CD80 (B7-1)



- Alfa, oblasti - Garnier-Robson
- Alfa, oblasti - Chou-Fasman
- Beta, oblasti - Garnier-Robson
- Beta, oblasti - Chou-Fasman
- Otáčka, oblasti - Garnier-Robson
- Otáčka, oblasti - Chou-Fasman
- Helix, oblasti - Garnier-Robson

Graf hydrofility - Kyte-Doolittle



- Alfa, amfipatické oblasti - Eisenberg
- Beta, amfipatické oblasti - Eisenberg
- Flexibilní oblasti - Karplus-Schulz

Antigenní index - Jameson-Wolf

Graf povrchové pravděpodobnosti - Emini

Kočičí B7-1 ORF

7/13

Obr. 3A-1

FeB72

GTTCCTGTGTTCCCTCGGGAATGTCACCTGAGCTTATACATCTGGTCTCTGGGAGCTGCAGT	60
GGATGGGCATTTGTGACAGCACTATGGGACTGAGTCACACTCTCCTTGTGATGGCCCTCC	
Met Gly Ile Cys Asp Ser Thr Met Gly Leu Ser His Thr Leu Leu Val Met Ala Leu	120

TGCTCTCTGGTGTTCCTCCATGAAGAGTCAAGCATATTTCAACAAGACTGGAGAAGTGC	
Leu Leu Ser Gly Val Ser Ser Met Lys Ser Gln Ala Tyr Phe Asn Lys Thr Gly Glu Leu	180

CATGCCATTTTACAAACTCTCAAACATAAGCCTGGATGAGCTGGTAGTATTTTGGCAGG	
Pro Cys His Phe Thr Asn Ser Gln Asn Ile Ser Leu Asp Glu Leu Val Val Phe Trp Gln	240

ACCAGGATAAGCTGGTTCTGTATGAGATATTCAGAGGCAAAGAGAACCCTCAAATGTTC	
Asp Gln Asp Lys Leu Val Leu Tyr Glu Ile Phe Arg Gly Lys Glu Asn Pro Gln Asn Val	300

ATCTCAAATATAAGGGCCGTACAAGCTTTGACAAGGACAACCTGGACCCTGAGACTCCACA	
His Leu Lys Tyr Lys Gly Arg Thr Ser Phe Asp Lys Asp Asn Trp Thr Leu Arg Leu His	360

ATGTTCAAGATCAAGGACAAGGGCACATATCACTGTTTCATTTCATTATAAAGGGCCCAAAG	
Asn Val Gln Ile Lys Asp Lys Gly Thr Tyr His Cys Phe Ile His Tyr Lys Gly Pro Lys	420

GACTAGTTCCCATGCACCAAATGAGTTCTGACCTATCAGTGCTTGCTAACTTCAGTCAAC	
Gly Leu Val Pro Met His Gln Met Ser Ser Asp Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln	480

CTGAAATAACAGTAACTTCTAATAGAACAGAAAATTCTGGCATCATAAATTTGACCTGCT	
Pro Glu Ile Thr Val Thr Ser Asn Arg Thr Glu Asn Ser Gly Ile Ile Asn Leu Thr Cys	540

CATCTATAACAAGGTTACCCAGAACCTAAGGAGATGTATTTTCAGCTAAACACTGAGAATT	
Ser Ser Ile Gln Gly Tyr Pro Glu Pro Lys Glu Met Tyr Phe Gln Leu Asn Thr Glu Asn	600

CAACTACTAAGTATGATACTGTCATGAAGAAATCTCAAATAATGTGACAGAAGTGTACA	
Ser Thr Thr Lys Tyr Asp Thr Val Met Lys Lys Ser Gln Asn Asn Val Thr Glu Leu Tyr	660

ACGTTTCTATCAGCTTGCCTTTTTTCAGTCCCTGAAGCACACAATGTGAGCGTCTTTTGTG	
Asn Val Ser Ile Ser Leu Pro Phe Ser Val Pro Glu Ala His Asn Val Ser Val Phe Cys	720

CCCTGAAACTGGAGACACTGGAGATGCTGCTCTCCCTACCTTTCAATATAGATGCACAAC	
Ala Leu Lys Leu Glu Thr Leu Glu Met Leu Leu Ser Leu Pro Phe Asn Ile Asp Ala Gln	780

CTAAGGATAAAGACCCTGAACAAGGCCACTTCCTCTGGATTGCGGCTGTACTTGTAATGT	
Pro Lys Asp Lys Asp Pro Glu Gln Gly His Phe Leu Trp Ile Ala Ala Val Leu Val Met	840

TTGTTGTTTTTTGTGGGATGGTGTCTTTAAACACTAAGGAAAAGGAAGAAGAAGCAGC	
Phe Val Val Phe Cys Gly Met Val Ser Phe Lys Thr Leu Arg Lys Arg Lys Lys Lys Gln	900

05.10.01

01-3116-00-Če

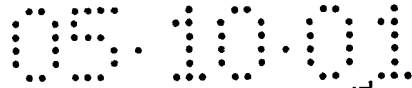
8/13

Obr. 3A-2

CTGGCCCTTCATGAATGTGAAACCATCAAAGGGAGAGAAAAGAGAGCAAACAGACCA 960
Pro Gly Pro Ser His Glu Cys Glu Thr Ile Lys Arg Glu Arg Lys Glu Ser Lys Gln Thr

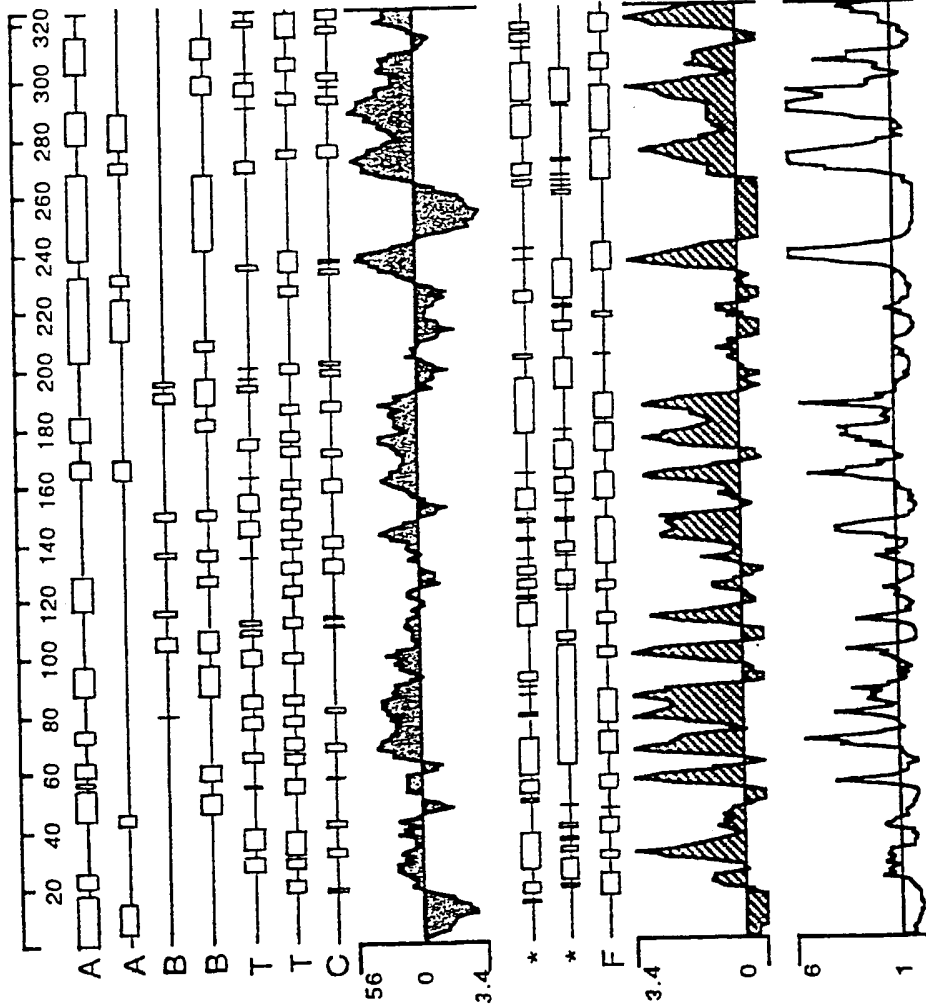
ACGAAAGAGTACCATACCACGTACCTGAGAGATCTGATGAAGCCCAGTGTGTTAACATTT 1020
Asn Glu Arg Val Pro Tyr His Val Pro Glu Arg Ser Asp Glu Ala Gln Cys Val Asn Ile

TGAAGACAGCCTCAGGGGACAAAAATCAGTAGGAAAATGGTGGCTTGGCGTGCTGACAAT 1080
Leu Lys Thr Ala Ser Gly Asp Lys Asn Gln



Obr. 3B

Graf hydrofobicity: Kočičí CD86 (B7-2)



- Alfa, oblasti - Garnier-Robson
- Alfa, oblasti - Chou-Fasman
- Beta, oblasti - Garnier-Robson
- Beta, oblasti - Chou-Fasman
- Otáčka, oblasti - Garnier-Robson
- Otáčka, oblasti - Chou-Fasman
- Helix, oblasti - Garnier-Robson

Graf hydrofility - Kyte-Doolittle

- Alfa, amfipatické oblasti - Eisenberg
- Beta, amfipatické oblasti - Eisenberg
- Flexibilní oblasti - Karplus-Schulz

Antigenní index - Jameson-Wolf

Graf povrchové pravděpodobnosti - Emini

Kočičí CD86

CD86 (B7-2)

10/13

Obr. 4A

FeCD28

ATGATCCTCAGGCTGCTTCTGGCTCTCAACTTCTTCCCCTCAATTCAAGTAACAGAAAAC
Met Ile Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Phe Phe Pro Ser Ile Gln Val Thr Glu Asn 60

AAGATTTTGGTGAAGCAGTTGCCAGGCTTGTGGTGTACAACAATGAGGTCAACCTTAGC 120
Lys Ile Leu Val Lys Gln Leu Pro Arg Leu Val Val Tyr Asn Asn Glu Val Asn Leu Ser

TGCAAGTACACTCACAACCTTCTTCTCAAAGGAGTTCCGGGCATCCCTTTATAAGGGAGTA 180
Cys Lys Tyr Thr His Asn Phe Phe Ser Lys Glu Phe Arg Ala Ser Leu Tyr Lys Gly Val

GATAGTGCTGTGGAAGTCTGCGTTGTGAATGGAAATTACTCCCATCAGCCTCAGTTCTAC 240
Asp Ser Ala Val Glu Val Cys Val Val Asn Gly Asn Tyr Ser His Gln Pro Gln Phe Tyr

TCAAGTACAGGATTCGACTGTGATGGGAAATTGGGCAATGAAACAGTGACATTCTACCTC 300
Ser Ser Thr Gly Phe Asp Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Thr Val Thr Phe Tyr Leu

CGAAATTTGTTTGTAAACCAAACGGATATTTACTTCTGCAAAAATTGAAGTCATGTATCCA 360
Arg Asn Leu Phe Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro

CCTCCTTACATAGACAATGAGAAGAGCAATGGGACCATTATCCACGTGAAAGAGAAACAT 420
Pro Pro Tyr Ile Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Glu Lys His

CTTTGTCCAGCTCAGCTGTCTCCTGAATCTTCCAAGCCATTTTGGGCACTGGTGGTGGTT 480
Leu Cys Pro Ala Gln Leu Ser Pro Glu Ser Ser Lys Pro Phe Trp Ala Leu Val Val Val

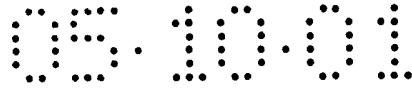
GGTGAATCCTAGGTTTCTACAGCTTGCTAGCAACAGTGGCTCTTGGTGCTTGCTGGATG 540
Gly Gly Ile Leu Gly Phe Tyr Ser Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Gly Ala Cys Trp Met

AAGACCAAGAGGAGTAGGATCCTTCAGAGTGAATATGAACATGACCCCCGGAGGCCA 600
Lys Thr Lys Arg Ser Arg Ile Leu Gln Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro

GGGCCCCACCCGAAGGCACTACCAACCTTACGCCCCAGCAGCGACTTTGCGGCATACCGT 660
Gly Pro Thr Arg Arg His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Ala Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg

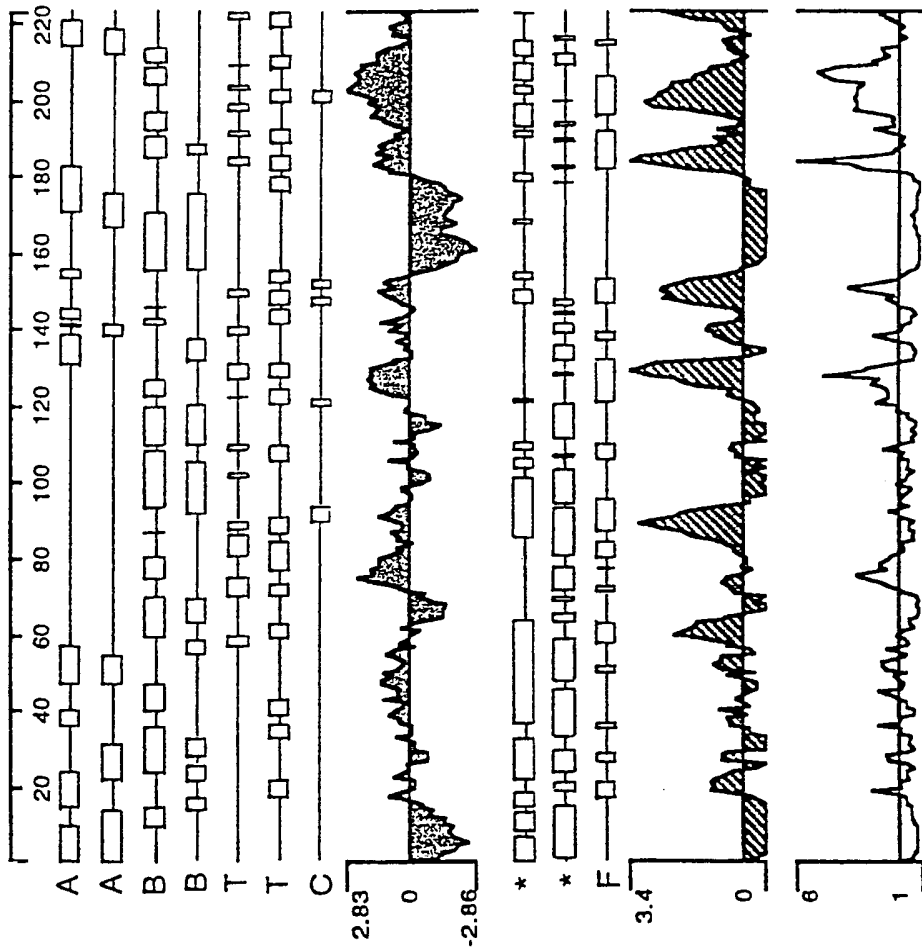
TCCTGACATGGACCCCTATCCAGAAGCC 688

Ser



Obr. 4B

Graf hydrofobicity: CD28



- Alfa, oblasti - Garnier-Robson
- Alfa, oblasti - Chou-Fasman
- Beta, oblasti - Garnier-Robson
- Beta, oblasti - Chou-Fasman
- Otáčka, oblasti - Garnier-Robson
- Otáčka, oblasti - Chou-Fasman
- Helix, oblasti - Garnier-Robson

Graf hydrofility - Kyte-Doolittle

- Alfa, amfipatické oblasti - Eisenberg
- Beta, amfipatické oblasti - Eisenberg
- Flexibilní oblasti - Karplus-Schulz

Antigenní index - Jameson-Wolf

Graf povrchové pravděpodobnosti - Emini

Neoznačen



12/13

Fe CTLA4

Obr. 5A

AACCTGAACACTGCTCCCATAAAGCCATGGCTTGGATTCCGGAGGCATGGGGCTC 60
Met Ala Cys Phe Gly Phe Arg Arg His Gly Ala

AGCTGGACCTGGCTTCTAGGACCTGGCCCTGCACTGCTCTGTTTTCTCTTCTTTATCC 120
Gln Leu Asp Leu Ala Ser Arg Thr Trp Pro Cys Thr Ala Leu Phe Ser Leu Leu Phe Ile

CCGTCTTCTCCAAAGGGATGCATGTGGCCCACCCTGCAGTGGTGCTGGCCAGCAGCCGAG 180
Pro Val Phe Ser Lys Gly Met His Val Ala His Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg

GTGTCGCCAGCTTCGTGTGTGAATATGGGTCTTCAGGCAATGCCGCCAAATTCCGAGTGA 240
Gly Val Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Gly Ser Ser Gly Asn Ala Ala Lys Phe Arg Val

CTGTGCTGAGGCCAAACTGGCAGCCAAATGACTGAAGTCTGTGCTGCGACATACACAGTGG 300
Thr Val Leu Arg Gln Thr Gly Ser Gln Met Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Thr Val

AGAATGAGTTGGCCTTCTAAATGATTCCACCTGCACTGGCATCTCCAGCGGAAACAAAG 360
Glu Asn Glu Leu Ala Phe Leu Asn Asp Ser Thr Cys Thr Gly Ile Ser Ser Gly Asn Lys

TGAACCTCACCATCCAAGGGTTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTGG 420
Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val

AGCTCATGTACCCACCACCCTACTATGCAGGCATGGGCAATGGAACCCAGATTTATGTCA 480
Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Ala Gly Met Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val

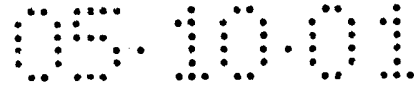
TCGATCCTGAACCTTGCCCAGATTCTGACTTCTCCTCTGGATCCTCGCAGCAGTCAGTT 540
Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser

CAGGATTGTTTTTTATAGCTTCTTATCACAGCTGTTTCTTTGAGCAAATGCTAAAGA 600
Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Ile Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys

AAAGAAGCCCTCTTACTACAGGGGTCTATGTGAAAATGCCCCAACAGAGCCAGAATGTG 660
Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys

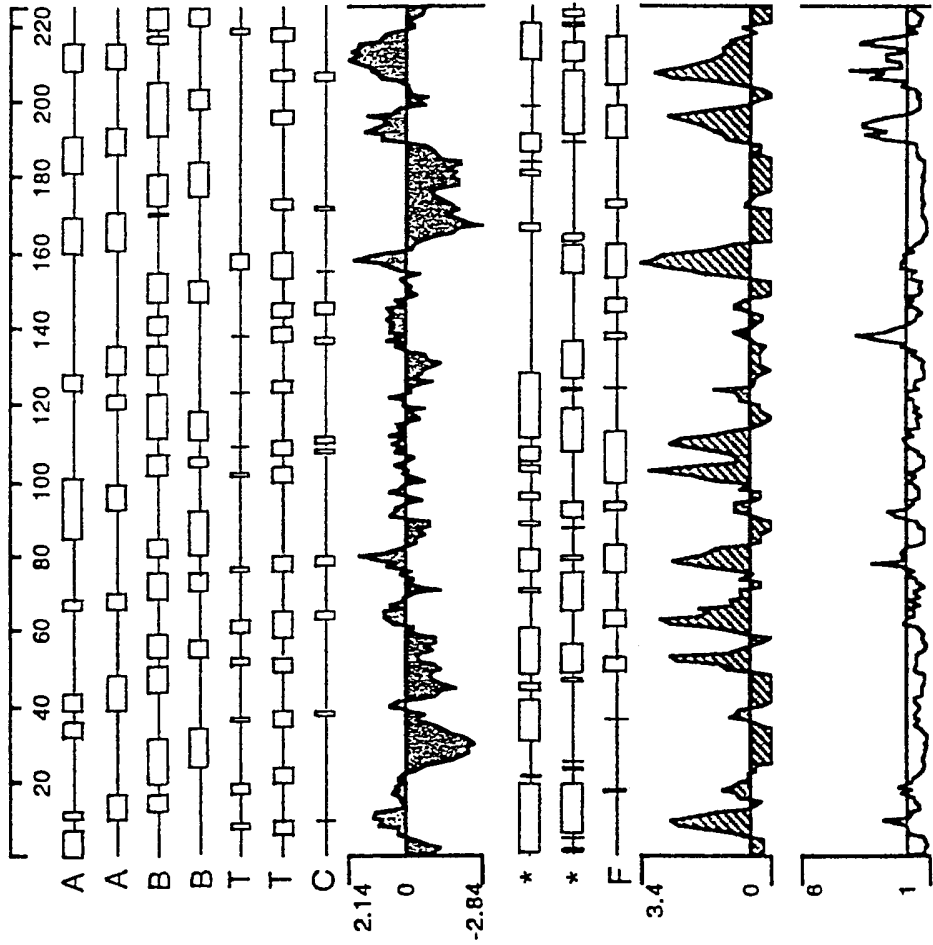
AAAAGCAATTTTCAGCCTTATTTTATCCCATCAATTGACACACCGTTATGAAGAAGGAAG 720
Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn

AACACTGTCCAATTTCTAAGAGCTGAGGC 749



Obr. 5B

Graf hydrofobicity: CTLA-4 (CD 152)



- Alfa, oblasti - Garnier-Robson
- Alfa, oblasti - Chou-Fasman
- Beta, oblasti - Garnier-Robson
- Beta, oblasti - Chou-Fasman
- Otáčka, oblasti - Garnier-Robson
- Otáčka, oblasti - Chou-Fasman
- Helix, oblasti - Garnier-Robson

- Graf hydrofility - Kyte-Doolittle

- Alfa, amfipatické oblasti - Eisenberg
- Beta, amfipatické oblasti - Eisenberg
- Flexibilní oblasti - Karplus-Schulz

- Antigenní index - Jameson-Wolf

- Graf povrchové pravděpodobnosti - Emini

- Neoznačen

Ejina CTLA-4

01-3116-00-Če

05.10.01

2406.

PV2000-3935

73727

SEKVENČNÍ PROTOKOL

<110> Collisson, Ellen W
Hash, Stephen M.
Insou, Choi

<120> kočiči CD80, kočiči CD86, kočiči CTLA-4 Nucleic Acid*
And Polypeptides

<130> 54954-A-PCT

<140> Not Yet Know

<141> 1999-04-30

<150> 09/071,699

<151> 1998-05-01

<160> 55

<170> Patent In. Ver. 2.0*

<210> 1

<211> 941

<212> DNA

<213> kočiči CD80

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(876)

<400> 1

atg ggt cac gca gca aag tgg aaa aca cca cta ctg aag cac cca tat 48
Met Gly His Ala Ala Lys Trp Lys Thr Pro Leu Leu Lys His Pro Tyr
1 5 10 15

ccc aag ctc ttt ccg ctc ttg atg cta gct agt ctt ttt tac ttc tgt 96
Pro Lys Leu Phe Pro Leu Leu Met Leu Ala Ser Leu Phe Tyr Phe Cys
20 25 30

tca ggt atc atc cag gtg aac aag aca gtg gaa gaa gta gca gta cta 144
Ser Gly Ile Ile Gln Val Asn Lys Thr Val Glu Glu Val Ala Val Leu
35 40 45

tcc tgt gat tac aac att tcc acc aaa gaa ctg acg gaa att cga atc 192
Ser Cys Asp Tyr Asn Ile Ser Thr Lys Glu Leu Thr Glu Ile Arg Ile
50 55 60

tat tgg caa aag gat gat gaa atg gtg ttg gct gtc atg tct ggc aaa 240

05.10.01

01-3116-00-Če

Tyr Trp Gln Lys Asp Asp Glu Met Val Leu Ala Val Met Ser Gly Lys	
65	70 75 80
gta caa gtg tgg ccc aag tac aag aac cgc aca ttc act gac gtc acc	288
Val Gln Val Trp Pro Lys Tyr Lys Asn Arg Thr Phe Thr Asp Val Thr	
	85 90 95
gat aac cac tcc att gtg atc atg gct ctg cgc ctg tca gac aat ggc	336
Asp Asn His Ser Ile Val Ile Met Ala Leu Arg Leu Ser Asp Asn Gly	
	100 105 110
aaa tac act tgt att att caa aag att gaa aaa ggg tct tac aaa gtg	384
Lys Tyr Thr Cys Ile Ile Gln Lys Ile Glu Lys Gly Ser Tyr Lys Val	
	115 120 125
aaa cac ctg act tcg gtg atg tta ttg gtc aga gct gac ttc cct gtc	432
Lys His Leu Thr Ser Val Met Leu Leu Val Arg Ala Asp Phe Pro Val	
	130 135 140
cct agt ata act gat ctt gga aat cca tct cat aac atc aaa agg ata	480
Pro Ser Ile Thr Asp Leu Gly Asn Pro Ser His Asn Ile Lys Arg Ile	
	145 150 155 160
atg tgc tta act tct gga ggt ttt cca aag cct cac ctc tcc tgg ctg	528
Met Cys Leu Thr Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro His Leu Ser Trp Leu	
	165 170 175
gaa aat gaa gaa gaa tta aat gcc atc aac aca aca gtt tcc caa gat	576
Glu Asn Glu Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp	
	180 185 190
cct gaa act gag ctc tac act att agc agt gaa ctg gat ttc aat atg	624
Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Glu Leu Asp Phe Asn Met	
	195 200 205
aca aac aac cat agc ttc ctg tgt ctt gtc aag tat gga aac tta cta	672
Thr Asn Asn His Ser Phe Leu Cys Leu Val Lys Tyr Gly Asn Leu Leu	
	210 215 220
gta tca cag atc ttc aac tgg caa aaa tca gag cca cag cct tct aat	720
Val Ser Gln Ile Phe Asn Trp Gln Lys Ser Glu Pro Gln Pro Ser Asn	
	225 230 235 240
aat cag ctc tgg atc att atc ctg agc tca gta gta agt ggg att gtt	768
Asn Gln Leu Trp Ile Ile Ile Leu Ser Ser Val Val Ser Gly Ile Val	
	245 250 255
gtg atc act gca ctt acc tta aga tgc cta gtc cac aga cct gct gca	816

01-3116-00-Če

05.10.01

Val Ile Thr Ala Leu Thr Leu Arg Cys Leu Val His Arg Pro Ala Ala
260 265 270

agg tgg aga caa aga gaa atg ggg aga gcg cgg aaa tgg aaa aga tct 864
Arg Trp Arg Gln Arg Glu Met Gly Arg Ala Arg Lys Trp Lys Arg Ser
275 280 285

cac ctg tct aca tagattctgc agaaccactg tatgcagagc atctggaggt 916
His Leu Ser Thr
290

agcctcttta gctcttctct actag 941

<210> 2

<211> 292

<212> PRT

<213> kočiči CD80

<400> 2

Met Gly His Ala Ala Lys Trp Lys Thr Pro Leu Leu Lys His Pro Tyr
1 5 10 15

Pro Lys Leu Phe Pro Leu Leu Met Leu Ala Ser Leu Phe Tyr Phe Cys
20 25 30

Ser Gly Ile Ile Gln Val Asn Lys Thr Val Glu Glu Val Ala Val Leu
35 40 45

Ser Cys Asp Tyr Asn Ile Ser Thr Lys Glu Leu Thr Glu Ile Arg Ile
50 55 60

Tyr Trp Gln Lys Asp Asp Glu Met Val Leu Ala Val Met Ser Gly Lys
65 70 75 80

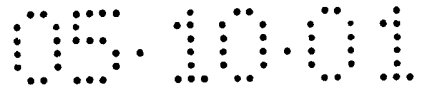
Val Gln Val Trp Pro Lys Tyr Lys Asn Arg Thr Phe Thr Asp Val Thr
85 90 95

Asp Asn His Ser Ile Val Ile Met Ala Leu Arg Leu Ser Asp Asn Gly
100 105 110

Lys Tyr Thr Cys Ile Ile Gln Lys Ile Glu Lys Gly Ser Tyr Lys Val
115 120 125

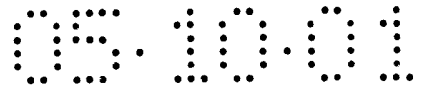
Lys His Leu Thr Ser Val Met Leu Leu Val Arg Ala Asp Phe Pro Val
130 135 140

Pro Ser Ile Thr Asp Leu Gly Asn Pro Ser His Asn Ile Lys Arg Ile



01-3116-00-Če

tca ggt atc atc cag gtg aac aag aca gtg gaa gaa gta gca gta cta	144
Ser Gly Ile Ile Gln Val Asn Lys Thr Val Glu Glu Val Ala Val Leu	
35 40 45	
tcc tgt gat tac aac att tcc acc aaa gaa ctg acg gaa att cga atc	192
Ser Cys Asp Tyr Asn Ile Ser Thr Lys Glu Leu Thr Glu Ile Arg Ile	
50 55 60	
tat tgg caa aag gat gat gaa atg gtg ttg gct gtc atg tct ggc aaa	240
Tyr Trp Gln Lys Asp Asp Glu Met Val Leu Ala Val Met Ser Gly Lys	
65 70 75 80	
gta caa gtg tgg ccc aag tac aag aac cgc aca ttc act gac gtc acc	288
Val Gln Val Trp Pro Lys Tyr Lys Asn Arg Thr Phe Thr Asp Val Thr	
85 90 95	
gat aac cac tcc att gtg atc atg gct ctg cgc ctg tca gac aat ggc	336
Asp Asn His Ser Ile Val Ile Met Ala Leu Arg Leu Ser Asp Asn Gly	
100 105 110	
aaa tac act tgt atc att caa aag att caa aaa ggg tct tac aaa gtg	384
Lys Tyr Thr Cys Ile Ile Gln Lys Ile Gln Lys Gly Ser Tyr Lys Val	
115 120 125	
aaa cac ctg act tcg gtg atg tta ttg gtc aga gct gac ttc cct gtc	432
Lys His Leu Thr Ser Val Met Leu Leu Val Arg Ala Asp Phe Pro Val	
130 135 140	
cct agt ata act gat ctt gga aat cca tct cat aac atc aaa agg ata	480
Pro Ser Ile Thr Asp Leu Gly Asn Pro Ser His Asn Ile Lys Arg Ile	
145 150 155 160	
atg tgc tta act tct gga ggt ttt cca aag cct cac ctc tcc tgg ctg	528
Met Cys Leu Thr Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro His Leu Ser Trp Leu	
165 170 175	
gaa aat gaa gaa gaa tta aat gcc atc aac aca aca gtt tcc caa gat	576
Glu Asn Glu Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp	
180 185 190	
cct gaa act gag ctc tac act att agc agt gaa ctg gat ttc aat atg	624
Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Glu Leu Asp Phe Asn Met	
195 200 205	
aca aac aac cat agc ttc ctg tgt ctt gtc aag tat gga aac tta ata	672
Thr Asn Asn His Ser Phe Leu Cys Leu Val Lys Tyr Gly Asn Leu Ile	
210 215 220	



01-3116-00-Če

gta tca cag atc ttc aac tgg caa aaa tca gag cca cag cct tct aat 720
Val Ser Gln Ile Phe Asn Trp Gln Lys Ser Glu Pro Gln Pro Ser Asn
225 230 235 240

aat cag ctc tgg atc att atc ctg agc tca gta gta agt ggg att gtt 768
Asn Gln Leu Trp Ile Ile Ile Leu Ser Ser Val Val Ser Gly Ile Val
245 250 255

gtg atc act gca ctt acc tta aga tgc cta gtc cac aga cct gct gca 816
Val Ile Thr Ala Leu Thr Leu Arg Cys Leu Val His Arg Pro Ala Ala
260 265 270

agg tgg aga caa aga gaa atg ggg aga gcg cgg aaa tgg aaa aga tct 864
Arg Trp Arg Gln Arg Glu Met Gly Arg Ala Arg Lys Trp Lys Arg Ser
275 280 285

cac ctg tct aca tag 879
His Leu Ser Thr
290

<210> 4

<211> 292

<212> PRT

<213> kočičići CD80

<400> 4

Met Gly His Ala Ala Lys Trp Lys Thr Pro Leu Leu Lys His Pro Tyr
1 5 10 15

Pro Lys Leu Phe Pro Leu Leu Met Leu Ala Ser Leu Phe Tyr Phe Cys
20 25 30

Ser Gly Ile Ile Gln Val Asn Lys Thr Val Glu Glu Val Ala Val Leu
35 40 45

Ser Cys Asp Tyr Asn Ile Ser Thr Lys Glu Leu Thr Glu Ile Arg Ile
50 55 60

Tyr Trp Gln Lys Asp Asp Glu Met Val Leu Ala Val Met Ser Gly Lys
65 70 75 80

Val Gln Val Trp Pro Lys Tyr Lys Asn Arg Thr Phe Thr Asp Val Thr
85 90 95

Asp Asn His Ser Ile Val Ile Met Ala Leu Arg Leu Ser Asp Asn Gly
100 105 110

05.10.01

01-3116-00-Če

Lys Tyr Thr Cys Ile Ile Gln Lys Ile Gln Lys Gly Ser Tyr Lys Val
115 120 125

Lys His Leu Thr Ser Val Met Leu Leu Val Arg Ala Asp Phe Pro Val
130 135 140

Pro Ser Ile Thr Asp Leu Gly Asn Pro Ser His Asn Ile Lys Arg Ile
145 150 155 160

Met Cys Leu Thr Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro His Leu Ser Trp Leu
165 170 175

Glu Asn Glu Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp
180 185 190

Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Glu Leu Asp Phe Asn Met
195 200 205

Thr Asn Asn His Ser Phe Leu Cys Leu Val Lys Tyr Gly Asn Leu Ile
210 215 220

Val Ser Gln Ile Phe Asn Trp Gln Lys Ser Glu Pro Gln Pro Ser Asn
225 230 235 240

Asn Gln Leu Trp Ile Ile Ile Leu Ser Ser Val Val Ser Gly Ile Val
245 250 255

Val Ile Thr Ala Leu Thr Leu Arg Cys Leu Val His Arg Pro Ala Ala
260 265 270

Arg Trp Arg Gln Arg Glu Met Gly Arg Ala Arg Lys Trp Lys Arg Ser
275 280 285

His Leu Ser Thr
290

<210> 5

<211> 1080

<212> DNA

<213> kočiči CD86

<220>

<221> CDS

<222> (63)..(1052)

<400> 5

gtttctgtgt tcctcgggaa tgctactgag cttatacatc tggtctctgg gagctgcagt 60



01-3116-00-Če

gg atg ggc att tgt gac agc act atg gga ctg agt cac act ctc ctt 107
Met Gly Ile Cys Asp Ser Thr Met Gly Leu Ser His Thr Leu Leu
1 5 10 15

gtg atg gcc ctc ctg ctc tct ggt gtt tct tcc atg aag agt caa gca 155
Val Met Ala Leu Leu Ser Gly Val Ser Ser Met Lys Ser Gln Ala
20 25 30

tat ttc aac aag act gga gaa ctg cca tgc cat ttt aca aac tct caa 203
Tyr Phe Asn Lys Thr Gly Glu Leu Pro Cys His Phe Thr Asn Ser Gln
35 40 45

aac ata agc ctg gat gag ctg gta gta ttt tgg cag gac cag gat aag 251
Asn Ile Ser Leu Asp Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Asp Lys
50 55 60

ctg gtt ctg tat gag ata ttc aga ggc aaa gag aac cct caa aat gtt 299
Leu Val Leu Tyr Glu Ile Phe Arg Gly Lys Glu Asn Pro Gln Asn Val
65 70 75

cat ctc aaa tat aag ggc cgt aca agc ttt gac aag gac aac tgg acc 347
His Leu Lys Tyr Lys Gly Arg Thr Ser Phe Asp Lys Asp Asn Trp Thr
80 85 90 95

ctg aga ctc cac aat gtt cag atc aag gac aag ggc aca tat cac tgt 395
Leu Arg Leu His Asn Val Gln Ile Lys Asp Lys Gly Thr Tyr His Cys
100 105 110

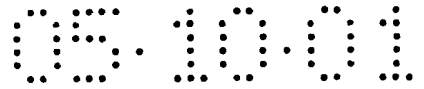
ttc att cat tat aaa ggg ccc aaa gga cta gtt ccc atg cac caa atg 443
Phe Ile His Tyr Lys Gly Pro Lys Gly Leu Val Pro Met His Gln Met
115 120 125

agt tct gac cta tca gtg ctt gct aac ttc agt caa cct gaa ata aca 491
Ser Ser Asp Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Thr
130 135 140

gta act tct aat aga aca gaa aat tct ggc atc ata aat ttg acc tgc 539
Val Thr Ser Asn Arg Thr Glu Asn Ser Gly Ile Ile Asn Leu Thr Cys
145 150 155

tca tct ata caa ggt tac cca gaa cct aag gag atg tat ttt cag cta 587
Ser Ser Ile Gln Gly Tyr Pro Glu Pro Lys Glu Met Tyr Phe Gln Leu
160 165 170 175

aac act gag aat tca act act aag tat gat act gtc atg aag aaa tct 635
Asn Thr Glu Asn Ser Thr Thr Lys Tyr Asp Thr Val Met Lys Lys Ser
180 185 190



01-3116-00-Če

caa aat aat gtg aca gaa ctg tac aac gtt tct atc agc ttg cct ttt 683
Gln Asn Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asn Val Ser Ile Ser Leu Pro Phe
195 200 205

tca gtc cct gaa gca cac aat gtg agc gtc ttt tgt gcc ctg aaa ctg 731
Ser Val Pro Glu Ala His Asn Val Ser Val Phe Cys Ala Leu Lys Leu
210 215 220

gag aca ctg gag atg ctg ctc tcc cta cct ttc aat ata gat gca caa 779
Glu Thr Leu Glu Met Leu Leu Ser Leu Pro Phe Asn Ile Asp Ala Gln
225 230 235

cct aag gat aaa gac cct gaa caa ggc cac ttc ctc tgg att gcg gct 827
Pro Lys Asp Lys Asp Pro Glu Gln Gly His Phe Leu Trp Ile Ala Ala
240 245 250 255

gta ctt gta atg ttt gtt gtt ttt tgt ggg atg gtg tcc ttt aaa aca 875
Val Leu Val Met Phe Val Val Phe Cys Gly Met Val Ser Phe Lys Thr
260 265 270

cta agg aaa agg aag aag aag cag cct ggc ccc tct cat gaa tgt gaa 923
Leu Arg Lys Arg Lys Lys Lys Gln Pro Gly Pro Ser His Glu Cys Glu
275 280 285

acc atc aaa agg gag aga aaa gag agc aaa cag acc aac gaa aga gta 971
Thr Ile Lys Arg Glu Arg Lys Glu Ser Lys Gln Thr Asn Glu Arg Val
290 295 300

cca tac cac gta cct gag aga tct gat gaa gcc cag tgt gtt aac att 1019
Pro Tyr His Val Pro Glu Arg Ser Asp Glu Ala Gln Cys Val Asn Ile
305 310 315

ttg aag aca gcc tca ggg gac aaa aat cag tag gaaaatggtg gcttggcgtg 1072
Leu Lys Thr Ala Ser Gly Asp Lys Asn Gln
320 325 330

ctgacaat 1080

<210> 6

<211> 329

<212> PRT

<213> kočiči CD86

<400> 6

Met Gly Ile Cys Asp Ser Thr Met Gly Leu Ser His Thr Leu Leu Val
1 5 10 15

05.10.01

01-3116-00-Če

Met Ala Leu Leu Leu Ser Gly Val Ser Ser Met Lys Ser Gln Ala Tyr
 20 25 30

Phe Asn Lys Thr Gly Glu Leu Pro Cys His Phe Thr Asn Ser Gln Asn
 35 40 45

Ile Ser Leu Asp Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Asp Lys Leu
 50 55 60

Val Leu Tyr Glu Ile Phe Arg Gly Lys Glu Asn Pro Gln Asn Val His
 65 70 75 80

Leu Lys Tyr Lys Gly Arg Thr Ser Phe Asp Lys Asp Asn Trp Thr Leu
 85 90 95

Arg Leu His Asn Val Gln Ile Lys Asp Lys Gly Thr Tyr His Cys Phe
 100 105 110

Ile His Tyr Lys Gly Pro Lys Gly Leu Val Pro Met His Gln Met Ser
 115 120 125

Ser Asp Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Thr Val
 130 135 140

Thr Ser Asn Arg Thr Glu Asn Ser Gly Ile Ile Asn Leu Thr Cys Ser
 145 150 155 160

Ser Ile Gln Gly Tyr Pro Glu Pro Lys Glu Met Tyr Phe Gln Leu Asn
 165 170 175

Thr Glu Asn Ser Thr Thr Lys Tyr Asp Thr Val Met Lys Lys Ser Gln
 180 185 190

Asn Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asn Val Ser Ile Ser Leu Pro Phe Ser
 195 200 205

Val Pro Glu Ala His Asn Val Ser Val Phe Cys Ala Leu Lys Leu Glu
 210 215 220

Thr Leu Glu Met Leu Leu Ser Leu Pro Phe Asn Ile Asp Ala Gln Pro
 225 230 235 240

Lys Asp Lys Asp Pro Glu Gln Gly His Phe Leu Trp Ile Ala Ala Val
 245 250 255

Leu Val Met Phe Val Val Phe Cys Gly Met Val Ser Phe Lys Thr Leu
 260 265 270

01-3116-00-Če

Arg Lys Arg Lys Lys Lys Gln Pro Gly Pro Ser His Glu Cys Glu Thr
 275 280 285

Ile Lys Arg Glu Arg Lys Glu Ser Lys Gln Thr Asn Glu Arg Val Pro
 290 295 300

Tyr His Val Pro Glu Arg Ser Asp Glu Ala Gln Cys Val Asn Ile Leu
 305 310 315 320

Lys Thr Ala Ser Gly Asp Lys Asn Gln
 325

<210> 7

<211> 688

<212> DNA

<213> kočiči CD28

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(663)

<400> 7

atg atc ctc agg ctg ctt ctg gct ctc aac ttc ttc ccc tca att caa 48
 Met Ile Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Phe Phe Pro Ser Ile Gln
 1 5 10 15

gta aca gaa aac aag att ttg gtg aag cag ttg ccc agg ctt gtg gtg 96
 Val Thr Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Leu Pro Arg Leu Val Val
 20 25 30

tac aac aat gag gtc aac ctt agc tgc aag tac act cac aac ttc ttc 144
 Tyr Asn Asn Glu Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Thr His Asn Phe Phe
 35 40 45

tca aag gag ttc cgg gca tcc ctt tat aag gga gta gat agt gct gtg 192
 Ser Lys Glu Phe Arg Ala Ser Leu Tyr Lys Gly Val Asp Ser Ala Val
 50 55 60

gaa gtc tgc gtt gtg aat gga aat tac tcc cat cag cct cag ttc tac 240
 Glu Val Cys Val Val Asn Gly Asn Tyr Ser His Gln Pro Gln Phe Tyr
 65 70 75 80

tca agt aca gga ttc gac tgt gat ggg aaa ttg ggc aat gaa aca gtg 288
 Ser Ser Thr Gly Phe Asp Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Thr Val
 85 90 95

05.10.01

01-3116-00-Če

aca ttc tac ctc cga aat ttg ttt gtt aac caa acg gat att tac ttc 336
 Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Leu Phe Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe
 100 105 110

tgc aaa att gaa gtc atg tat cca cct cct tac ata gac aat gag aag 384
 Cys Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Ile Asp Asn Glu Lys
 115 120 125

agc aat ggg acc att atc cac gtg aaa gag aaa cat ctt tgt cca gct 432
 Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Glu Lys His Leu Cys Pro Ala
 130 135 140

cag ctg tct cct gaa tct tcc aag cca ttt tgg gca ctg gtg gtg gtt 480
 Gln Leu Ser Pro Glu Ser Ser Lys Pro Phe Trp Ala Leu Val Val Val
 145 150 155 160

ggc gga atc cta ggt ttc tac agc ttg cta gca aca gtg gct ctt ggt 528
 Gly Gly Ile Leu Gly Phe Tyr Ser Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Gly
 165 170 175

gct tgc tgg atg aag acc aag agg agt agg atc ctt cag agt gac tat 576
 Ala Cys Trp Met Lys Thr Lys Arg Ser Arg Ile Leu Gln Ser Asp Tyr
 180 185 190

atg aac atg acc ccc cgg agg cca ggg ccc acc cga agg cac tac caa 624
 Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Arg His Tyr Gln
 195 200 205

cct tac gcc cca gca cgc gac ttt gcg gca tac cgt tcc tgacatggac 673
 Pro Tyr Ala Pro Ala Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 210 215 220

ccctatccag aagcc 688

<210> 8
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> kočičí CD28

<400> 8
 Met Ile Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Phe Phe Pro Ser Ile Gln
 1 5 10 15

Val Thr Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Leu Pro Arg Leu Val Val
 20 25 30

Tyr Asn Asn Glu Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Thr His Asn Phe Phe

05.10.01

01-3116-00-Če

```

          35                40                45
Ser Lys Glu Phe Arg Ala Ser Leu Tyr Lys Gly Val Asp Ser Ala Val
   50                55                60
Glu Val Cys Val Val Asn Gly Asn Tyr Ser His Gln Pro Gln Phe Tyr
   65                70                75                80
Ser Ser Thr Gly Phe Asp Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Thr Val
          85                90                95
Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Leu Phe Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe
          100                105                110
Cys Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Ile Asp Asn Glu Lys
          115                120                125
Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Glu Lys His Leu Cys Pro Ala
          130                135                140
Gln Leu Ser Pro Glu Ser Ser Lys Pro Phe Trp Ala Leu Val Val Val
          145                150                155                160
Gly Gly Ile Leu Gly Phe Tyr Ser Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Gly
          165                170                175
Ala Cys Trp Met Lys Thr Lys Arg Ser Arg Ile Leu Gln Ser Asp Tyr
          180                185                190
Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Arg His Tyr Gln
          195                200                205
Pro Tyr Ala Pro Ala Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
          210                215                220
```

<210> 9

<211> 749

<212> DNA

<213> kočiči CTLA-4

<220>

<221> CDS

<222> (27)..(698)

<400> 9

```
aacctgaaca ctgctcccat aaagcc atg gct tgc ttt gga ttc cgg agg cat 53
Met Ala Cys Phe Gly Phe Arg Arg His
```

1	5	
ggg gct cag ctg gac ctg gct tct agg acc tgg ccc tgc act gct ctg	101	
Gly Ala Gln Leu Asp Leu Ala Ser Arg Thr Trp Pro Cys Thr Ala Leu		
10 15 20 25		
ttt tct ctt ctc ttt atc ccc gtc ttc tcc aaa ggg atg cat gtg gcc	149	
Phe Ser Leu Leu Phe Ile Pro Val Phe Ser Lys Gly Met His Val Ala		
30 35 40		
cac cct gca gtg gtg ctg gcc agc agc cga ggt gtc gcc agc ttc gtg	197	
His Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Val Ala Ser Phe Val		
45 50 55		
tgt gaa tat ggg tct tca ggc aat gcc gcc aaa ttc cga gtg act gtg	245	
Cys Glu Tyr Gly Ser Ser Gly Asn Ala Ala Lys Phe Arg Val Thr Val		
60 65 70		
ctg agg caa act ggc agc caa atg act gaa gtc tgt gct gcg aca tac	293	
Leu Arg Gln Thr Gly Ser Gln Met Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr		
75 80 85		
aca gtg gag aat gag ttg gcc ttc cta aat gat tcc acc tgc act ggc	341	
Thr Val Glu Asn Glu Leu Ala Phe Leu Asn Asp Ser Thr Cys Thr Gly		
90 95 100 105		
atc tcc agc gga aac aaa gtg aac ctc acc atc caa ggg ttg agg gcc	389	
Ile Ser Ser Gly Asn Lys Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala		
110 115 120		
atg gac acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca cca	437	
Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro		
125 130 135		
ccc tac tat gca ggc atg ggc aat gga acc cag att tat gtc atc gat	485	
Pro Tyr Tyr Ala Gly Met Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp		
140 145 150		
cct gaa cct tgc cca gat tct gac ttc ctc ctc tgg atc ctc gca gca	533	
Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala		
155 160 165		
gtc agt tca gga ttg ttt ttt tat agc ttc ctt atc aca gct gtt tct	581	
Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Ile Thr Ala Val Ser		
170 175 180 185		
ttg agc aaa atg cta aag aaa aga agc cct ctt act aca ggg gtc tat	629	
Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr		

190 195 200
 gtg aaa atg ccc cca aca gag cca gaa tgt gaa aag caa ttt cag cct 677
 Val Lys Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro
 205 210 215

tat ttt att ccc atc aat tga cacaccgtta tgaagaagga agaacactgt 728
 Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
 220

ccaatttcta agagctgagg c 749

<210> 10
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> kočiči CTLA-4

<400> 10
 Met Ala Cys Phe Gly Phe Arg Arg His Gly Ala Gln Leu Asp Leu Ala
 1 5 10 15

Ser Arg Thr Trp Pro Cys Thr Ala Leu Phe Ser Leu Leu Phe Ile Pro
 20 25 30

Val Phe Ser Lys Gly Met His Val Ala His Pro Ala Val Val Leu Ala
 35 40 45

Ser Ser Arg Gly Val Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Gly Ser Ser Gly
 50 55 60

Asn Ala Ala Lys Phe Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Thr Gly Ser Gln
 65 70 75 80

Met Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Thr Val Glu Asn Glu Leu Ala
 85 90 95

Phe Leu Asn Asp Ser Thr Cys Thr Gly Ile Ser Ser Gly Asn Lys Val
 100 105 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
 115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Ala Gly Met Gly
 130 135 140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
 145 150 155 160

01-3116-00-Če

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe
 165 170 175

Tyr Ser Phe Leu Ile Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys
 180 185 190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu
 195 200 205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
 210 215 220

<210> 11

<211> 40

<212> DNA

<213> kočičí CD80 primer

<400> 11

cgcgatccg caccatgggt cacgcagcaa agtggaaaac

40

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> kočičí CD80 primer

<400> 12

cctagtagag aagagctaaa gaggc

25

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<213> kočičí CD28 primer

<400> 13

cgcgatcca ccggtagcac aatgatcctc agg

33

<210> 14

<211> 31

<212> DNA

<213> kočičí CD28 primer

<400> 14

cgcgatcct ctggataggg gtccatgtca g

31

01-3116-00-Če

<210> 15
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> kočičí CTLA-4 primer

 <400> 15
 atggcttcgc cttggatttc cagcagg 27

 <210> 16
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> kočičí CTLA-4 primer

 <400> 16
 tcaattgaat gaggaataaa ataaggctg 29

 <210> 17
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> kočičí CTLA-4 primer

 <400> 17
 tgttgggttt ctgactctga cttccctg 28

 <210> 18
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> kočičí CTLA-4 primer

 <400> 18
 gcatagtagg gtggtgggta catg 24

 <210> 19
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> kočičí CTLA-4 primer

 <400> 19
 tgttgggttt ctgactctga cttccctg 28

 <210> 20

01-3116-00-Če

<211> 20
 <212> DNA
 <213> kočičí CTLA-4 primer

 <400> 20
 acatgagctc caccttgag 20

<210> 21
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> kočičí CTLA-4 primer

 <400> 21
 ccacccctaat acgactcact atagggc 27

<210> 22
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> kočičí CTLA-4 primer

 <400> 22
 gtgaatatgg gtcttcaggc aatg 24

<210> 23
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> kočičí CTLA-4 primer

 <400> 23
 actcactata gggctcgagc ggc 23

<210> 24
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> kočičí CTLA-4 primer

 <400> 24
 gaaatccgag tgactgtgct gag 23

<210> 25
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> kočičí CTLA-4 primer

01-3116-00-Če

<400> 25
 aacctgaaca ctgctcccat aaag 24

<210> 26
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> kočiči CTLA-4 primer

<400> 26
 gcctcagctc ttagaaattg gacag 25

<210> 27
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> kočiči CD86 primer

<400> 27
 tagtattttg gcaggaccag g 21

<210> 28
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> kočiči CD86 primer

<400> 28
 ctgtgacatt atcttgagat ttc 23

<210> 29
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> kočiči CD86 primer

<400> 29
 gagcatgcac taatgggact gag 23

<210> 30
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> kočiči CD86 primer

<400> 30
 ctgtgacatt atcttgagat ttc 23

01-3116-00-Če

<210> 31
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> kočiči CD86 primer

 <400> 31
 ccatcctaatacgcactcact atagggc 27

 <210> 32
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> kočiči CD86 primer

 <400> 32
 tgggtaacct tgtatagatg agcaggtc 28

 <210> 33
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> kočiči CD86 primer

 <400> 33
 actcactata gggctcgagc ggc 23

 <210> 34
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> kočiči CD86 primer

 <400> 34
 caggttgact gaagttagca agcac 25

 <210> 35
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> kočiči CD86 primer

 <400> 35
 ccatcctaatacgcactcact atagggc 27

 <210> 36

01-3116-00-Če

<211> 25
 <212> DNA
 <213> kočičí CD86 primer

<400> 36
 ggacaagggc acatatcact gtttc 25

<210> 37
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> kočičí CD86 primer

<400> 37
 actcactata gggctcgagc ggc 23

<210> 38
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> kočičí CD86 primer

<400> 38
 cagtgcttgc taacttcagt caacc 25

<210> 39
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> kočičí CD86 primer

<400> 39
 cgggaatgtc actgagctta tag 23

<210> 40
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> kočičí CD86 primer

<400> 40
 gatctttttc aggttagcag ggg 23

<210> 41
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> kočičí CD80 primer

01-3116-00-Če

<400> 41
 atgggtcacg cagcaaagtg 20

<210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> kočiči CD80 primer

<400> 42
 ctatgtagac aggtgagatc 20

<210> 43
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> kočiči CD80 primer

<400> 43
 caggaaacag ctatgac 17

<210> 44
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> kočiči CD80 primer

<400> 44
 aatacgactc actatagg 18

<210> 45
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> kočiči CD80 primer

<400> 45
 aacaccattt catcaccctt t 21

<210> 46
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> kočiči CD80 primer

<400> 46
 atacaagtgt atttgccatt gtc 23

01-3116-00-Če

<210> 47
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> kočičí CD80 primer

 <400> 47
 agctctgacc aataacatca 20

 <210> 48
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> kočičí CD80 primer

 <400> 48
 attagaaatc cagttcactg ct 22

 <210> 49
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> kočičí CD80 primer

 <400> 49
 tcatgtctgg caaagtacaa g 21

 <210> 50
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> kočičí CD80 primer

 <400> 50
 attcactgac gtcaccga 18

 <210> 51
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> kočičí CD80 primer

 <400> 51
 aaggctgtgg ctctga 16

 <210> 52

01-3116-00-Če

<211> 29

<212> DNA

<213> kočičí CD80 primer

<400> 52

tcgagaattc gggtcacgca gcaaagtgg

29

<210> 53

<211> 32

<212> DNA

<213> kočičí CD80 primer

<400> 53

gctaggatcc aatctatgta gacaggtgag at

32

<210> 54

<211> 32

<212> DNA

<213> kočičí CD80 primer

<400> 54

gatgaattcc atgacacctca ggctgggctt ct

32

<210> 55

<211> 29

<212> DNA

<213> kočičí CD80 primer

<400> 55

gatcagatct caggaacggt atgccgcaa

29