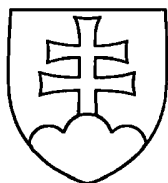


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD  
PRIEMYSELNÉHO  
VLASTNÍCTVA  
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

## ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania prihlášky: 19. 5. 1999  
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 9810759.2  
9821129.5  
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: 19. 5. 1998  
29. 9. 1998  
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: GB, GB  
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: 11. 6. 2001  
Vestník ÚPV SR č.: 06/2001  
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:  
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: PCT/GB99/01588  
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: WO99/60120

(21) Číslo dokumentu:

# 1733-2000

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.7:

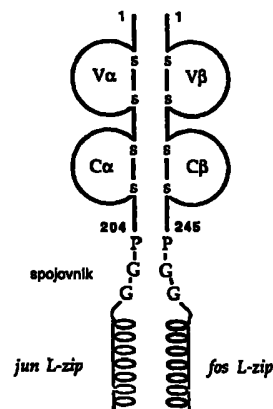
C12N 15/12  
C07K 14/725  
C07K 19/00  
C07K 14/82

- (71) Prihlasovateľ: AVIDEX LIMITED, Milton, Oxon, GB;  
(72) Pôvodca: Jakobsen Bent Karsten, Milton, Oxford, GB;  
Bell John Irving, Oxford, Oxfordshire, GB;  
Gao George Fu, Boston, MA, US;  
Willcox Benjamin Ernest, Pasadena, CA, US;  
Boulter Jonathan Michael, Milton, Oxford, GB;  
(74) Zástupca: Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;

(54) Názov: Preskladaný rekombinantný T bunkový receptor-TCR, sekvencie nukleových kyselín, ktoré kódujú rekombinantné TCR reťazce rekombinantného TCR, a spôsob jeho výroby

(57) Anotácia:

Je opísaný preskladaný rekombinantný T bunkový receptor a biologicky aktívny T bunkový receptor (TCR) obsahuje rekombinantnú TCR  $\alpha$  alebo  $\gamma$  reťazovú extracelulárnu doménu, ktorá obsahuje prvý heterológny C-koncový dimerizačný peptid; a rekombinantnú TCR  $\beta$  alebo  $\delta$  reťazovú extracelulárnu doménu, ktorá obsahuje druhý C-koncový dimerizačný peptid, ktorý vytvára špecifický heterodimér s prvým dimerizačným peptidom, čím sa vytvorí heterodimerizačná doména, ktorou môže byť doména stočeného závit. Sú opísané sekvencie nukleových kyselín, ktoré kódujú rekombinantný TCR a spôsob výroby rekombinantného TCR. TCR môže byť značený detegovateľnou značkou tak, aby bolo možné detegovať špecifické MHC-peptidové komplexy. Alternatívne môže byť spojený s terapeutickými činidlami, ako napríklad cytotoxickým činidlom alebo imunostimulačným činidlom, aby bolo možné doručiť činidlo na miesto špecifického MHC-peptidového komplexu.



SK 1733-2000 A3



- 1 -

Preskladaný rekombinantný T bunkový receptor - TCR, sekvencie nukleových kyselín, ktoré kódujú rekombinantné TCR reťazce rekombinantného TCR a spôsob jeho výroby

### Oblasť techniky

Vynález sa týka rekombinantných T bunkových receptorov (TCRs) nenaviazaných na membránu a spôsobov a reakčných činidiel na ich produkciu.

### Doterajší stav techniky

#### 1. Prezentácia antigénu na bunkovom povrchu

MHC molekuly sú špecializované proteínové komplexy, ktoré prezentujú krátke proteínové fragmenty, peptidové antigény, na bunkovom povrchu, aby boli rozpoznávané bunkovou časťou adaptívneho imunitného systému.

MHC triedy I je dimérny proteínový komplex pozostávajúci s variabilného ťažkého reťazca a konštantného ľahkého reťazca,  $\beta$ 2mikroglobulín. MHC triedy I prezentuje peptidy, ktoré sú spracovávané vo vnútri bunky, naložené do väzobnej štrbiny v MHC a transportované na bunkový povrch, kde sa komplex ukotví do membrány prostredníctvom MHC ťažkého reťazca. Peptidy sú zvyčajne dlhé 8 až 11 aminokyselín v závislosti na stupni vykľenutia zavedeného do peptidu pri väzbe v MHC. Väzobná štrbina, ktorá je tvorená membránovými distálnymi  $\alpha$ 1 a  $\alpha$ 2 doménami MHC ťažkého reťazca, má "uzavreté" konce, čo dosť tesne obmedzuje dĺžku peptidu, ktorý sa môže viazať.

Aj MHC triedy II je dimérny proteín pozostávajúci s  $\alpha$  (ťažkého) a  $\beta$  (ľahkého) reťazca, pričom oba tieto reťazce sú variabilné glykoproteíny, a sú ukotvené v bunke transmembránovými doménami. Podobne ako MHC triedy I, vytvára molekula MHC triedy II väzobnú štrbinu, do ktorej sa začleňujú väčšie peptidy s dĺžkou 12 až 24 aminokyselín. Peptidy sa prijímajú z extracelulárneho prostredia



endocytózou a pred naložením na komplex triedy II, ktorý ich transportuje na bunkový povrch, sa spracovávajú.

Každá bunka prezentuje peptidy na až šiestich rôznych molekulách triedy I a na podobnom množstve molekúl triedy II, pričom celkový počet MHC komplexov, ktoré sa nachádzajú v bunke je v rozsahu  $10^5$  až  $10^6$  na bunku. Typicky sa odhaduje, že diverzita peptidov prezentovaných na molekulách triedy I je medzi 1000 a 10000, pričom 90 % z nich je prezentovaných v 100 až 1000 kópiách na bunku (Hunt, Michel a ďalší, 1992; Chicz, Urban a ďalší 1993; Engelhard, Appella a ďalší 1993; Huczko, Bodnar a ďalší 1993). Najprevládajúcejšie peptidy tvoria 0,4 až 5 % celkových prezentovaných peptidov, čo znamená, že by mohlo byť prezentovaných do 20000 identických komplexov. Avšak je pravdepodobné, že priemerný počet najviac prevládajúcich jednotlivých peptidových komplexov je v rozsahu 2000 až 4000 na bunku, a typické prezentačné úrovne rozoznateľných T bunkových epitopov sú v rozsahu 100 až 500 komplexov na bunku (pozri zhrnutie (Engelhard 1994)).

## 2. Rozoznávanie antigén prezentujúcich buniek

Antigén môže prezentovať široké spektrum buniek, vo forme MHC-peptid, a bunky, ktoré túto vlastnosť majú, sú známe ako antigén prezentujúce bunky (APC). Typ bunky, ktorá prezentuje konkrétny antigén, závisí na tom ako a kde sa bunky imunitného systému prvý krát stretávajú s antigénom. APCs zahŕňajú dendritické bunky prepojené prstencovitými výbežkami, ktoré sa vo veľkom množstve nachádzajú v T bunkových oblastiach lymfatických uzlín a sleziny; Langerhansove bunky v koži; folikulárne dendritické bunky v B bunkových oblastiach lymfatického tkaniva; monocyty, makrofágy a iné bunky monocytovej/makrofágovej línie; B bunky a T bunky; a rôzne iné bunky, ako napríklad endoteliálne bunky a fibroblasty, ktoré nie sú klasickými APCs, ale môžu účinkovať rovnakým spôsobom ako APC.

APCs sú rozoznávané podtriedou lymfocytov, ktoré zrejú v týmuse (T bunky), kde prebieha ich selekcia, ktorá je nastavená tak, že zaisťuje, aby boli T bunky, ktoré odpovedajú na vlastné peptidy, zničené (negatívna selekcia). Okrem toho, T

bunky, ktoré nie sú schopné rozoznávať prezentované MHC varianty (u človeka HLA haplotypy), nevyzrievajú (pozitívna selekcia).

Rozoznávanie špecifických MHC-peptidových komplexov T bunkami je sprostredkované T bunkovým receptorom (TCR), ktorý pozostáva z  $\alpha$ - a  $\beta$ -reťazca, pričom oba tieto reťazce sú ukotvené v membráne. V procese rekombinácie podobnom s procesom pozorovaným pre gény protilátok, sa TCR  $\alpha$  a  $\beta$  gény preskupujú z Variabilných, Spojovacích, Diverzitných a Konštantných elementov, čím vytvárajú enormnú diverzitu extracelulárnych antigén viažucich domén ( $10^{13}$  až  $10^{15}$  rôznych možností). TCRs existujú aj v odlišnej forme, s  $\gamma$  a  $\delta$  reťazcami, ale tieto sú prítomné len na približne 5 % T buniek.

Protilátky a TCRs sú jediné dva typy molekúl, ktoré rozoznávajú antigény špecifickým spôsobom, takže TCR je jediný receptor špecifický pre konkrétne peptidové antigény prezentované na MHC, pričom cudzí peptid je často jedinou známkou abnormality vo vnútri bunky.

TCRs sú exprimované s enormnou diverzitou, každý TCR je špecifický pre jeden alebo niekoľko MHC-peptidových komplexov. Kontakty medzi TCR a MHC-peptidovými ligandami trvajú extrémne krátko, zvyčajne majú polčas rozpadu kratší ako jednu sekundu. Adhézia medzi T bunkami a cieľovými bunkami, pravdepodobne TCR/MHC-peptid, závisí na uskutočnení viacnásobných TCR/MHC-peptid kontaktov, ako aj na množstve kontaktov medzi koreceptorom a ligandom.

Rozoznávanie T bunkou nastáva, keď sú T-bunka a antigén prezentujúca bunka (APC) v priamom fyzickom kontakte, a iniciuje sa ligáciou komplexov antigén špecifických TCRs s pMHC. TCR je heterodimérny bunkový povrchový proteín patriaci do superrodiny imunoglobulínov, ktorý je spojený s nepremenlivými proteínmi CD3 komplexu, ktorý sa podieľa na sprostredkovaní prenosu signálu. TCRs existujú v  $\alpha\beta$  a  $\gamma\delta$  formách, ktoré sú štrukturálne podobné, ale majú dosť odlišnú anatomickú lokalizáciu a pravdepodobne aj funkcie. Extracelulárna časť receptora pozostáva z dvoch membránovo-proximálnych konštantných domén a dvoch membránovo-distálnych variabilných domén, ktoré nesú vysoko polymorné slučky analogické s komplementaritou determinujúcimi oblasťami (CDRs) protilátok.

Práve tieto slučky vytvárajú MHC-väzobné miesto TCR molekuly a determinujú peptidovú špecificitu. MHC triedy I a triedy II ligandy sú tiež proteíny patriace do imunoglobulínovej superrodiny, ale sú špecializované na prezentáciu antigénu, pričom majú vysoko polymorfné peptid viažuce miesto, ktoré im umožňuje prezentovať rôznu zostavu krátkych peptidových fragmentov na APC bunkovom povrchu.

V súčasnosti sa štrukturálne charakterizovali príklady týchto interakcií (Garboczi, Ghosh a ďalší 1996; Garcia, Degano a ďalší 1996; Ding, Smith a ďalší 1998). Z kryštalografických štruktúr hľodavčích a ľudských komplexov pMHC triedy I-TCR vyplýva diagonálna orientácia TCR na jeho pMHC ligand, a slabá tvarová komplementarita na rozhraní. Len CDR3 slučky prichádzajú do kontaktu s peptidovými zvyškami. Z porovnania TCR štruktúr s ligandom a bez ligandu tiež vyplýva, že existuje určitý stupeň flexibility v TCR CDR slučkách (Garboczi a Biddison 1999).

Modely aktivácie T bunky sa pokúšajú vysvetliť ako takéto proteín-proteín interakcie medzi T bunkou a antigén prezentujúcou bunkou (APC) iniciujú odpovede, ako napríklad usmrtenie vírusom infikovanej cieľovej bunky. V mnohých týchto modeloch sú zahrnuté fyzikálne vlastnosti TCR-pMHC interakcií ako kritické parametre. Napríklad sa zistilo, že kvantitatívne zmeny v TCR disociačných rýchlostiach sa prenášajú do kvalitatívnych rozdielov v biologickom výstupe receptorového spojenia, ako napríklad úplná alebo čiastočná aktivácia T bunky alebo antagonizmus (Matsui, Boniface a ďalší 1994; Rabinowitz, Beeson a ďalší 1996; Davis, Boniface a ďalší 1998).

Ukázalo sa, že TCR-pMHC interakcie majú nízke afinity a relatívne pomalé kinetiky. Mnohé štúdie využívali biosenzorovú technológiu, ako napríklad Biacore™ (Willcox, Gao a ďalší 1999; Weyer, Willcox a ďalší 1999), ktorá využíva povrchovú plazmonovú rezonanciu (SPR) a umožňuje priame afinitné merania a merania skutočného času kinetiky interakcií proteín-proteín (Garcia, Scott a ďalší 1996; Davis, Boniface a ďalší 1998). Avšak študované receptory sú buď aloreaktívne TCRs, alebo receptory, ktoré boli vyvolané ako odpoveď na umelý imunogén.

### 3. TCR a CD8 interakcie s MHC-peptidovými komplexami

Značná väčšina T buniek vymedzená MHC triedy I-peptidovými komplexami vyžaduje na aktiváciu aj zapojenie koreceptora CD8, zatiaľ čo T bunky vymedzené MHC triedy II vyžadujú zapojenie CD4. Presná funkcia koreceptorov v aktivácii T buniek nie je ešte úplne jasná. Ani to nie sú kritické mechanizmy a parametre riadenia aktivácie. Avšak tak CD8, ako aj CD4 majú cytoplazmatické domény, ktoré sa spájajú s kinázou p56<sup>lck</sup>, ktorá sa podieľa na úplne najskoršej tyrozínovej fosforylácii typickej pre aktiváciu T buniek. CD8 je dimérny receptor exprimovaný buď v  $\alpha\alpha$  forme, alebo, bežnejšie, v  $\alpha\beta$  forme. CD4 je monomér. V CD8 receptore sa s p56<sup>lck</sup> spája len  $\alpha$ -reťazec.

Terajšie stanovovania fyzikálnych parametrov riadiacich väzbu TCR a CD8 na MHC použitím rozpustných verzií receptorov ukázali, že pri rozoznávaní je dominantnou väzba prostredníctvom TCR. TCR má významne vyššiu afinitu voči MHC ako koreceptory (Willcox, Gao a ďalší 1999; Wyer, Willcox a ďalší 1999).

Jednotlivé interakcie receptorov s MHC trvajú pri fyziologickej teplote, tzn. 37 °C, veľmi krátko. Približná hodnota polčasu rozpadu TCR-MHC/peptidovej interakcie, meraná s ľudským TCR špecifickým pre influenza vírusový "matricový" peptid prezentovaný prostredníctvom HLA-A\*0201(HLA-A2) je 0,7 sekundy. Polčas rozpadu CD8 $\alpha\alpha$  interakcie s týmto MHC/peptidovým komplexom je kratší ako 0,01 sekundy, tzn. komplex sa rozpadáva 18 krát rýchlejšie.

### 4. Produkcia rozpustných MHC-peptidových komplexov

Rozpustné MHC-peptidové komplexy sa najprv získavali štiepením povrchových molekúl antigén prezentujúcich buniek papainom (Bjorkman, Strominger a ďalší 1985). Hoci tento prístup poskytoval materiál na kryštalizáciu, v súčasnosti bol pre molekuly triedy I nahradený oddelenou expresiou ťažkého a ľahkého reťazca v *E. coli* a následne poskladaním v prítomnosti syntetického peptidu (Garboczi, Hung a ďalší 1992; Madden, Garboczi a ďalší 1993; Garboczi, Madden a ďalší 1994; Reid, McAdam a ďalší 1996; Reid, Smith a ďalší 1996; Smith, Reid a ďalší 1996; Reid, Smith a ďalší 1996; Gao, Tormo a ďalší 1997; Gao,

Gerth a ďalší 1998). Tento prístup má niekoľko výhod oproti predchádzajúcim metódam v tom, že sa získava vyšší výťažok pri nižších nákladoch, veľmi presne je možné kontrolovať identitu peptidu a finálny produkt je homogénnejší. Navyše je možné jednoducho uskutočniť expresiu modifikovaného ťažkého alebo ľahkého reťazca, napríklad fúzaním s proteínovým príveskom.

## 5. Rozpustný TCR

Doteraz neboli publikované žiadne údaje týkajúce sa interakcií ľudského TCR a pMHC a žiadne štúdie analyzujúce prirodzene vybrané TCRs špecifické pre prirodzené (napr. vírusové) epitopy. To môže odrážať ťažkosti pri získavaní proteínu, ktorý je vhodný na SPR, tzn. proteínu, ktorý je homogénny, monomérny, správne poskladaný, dostupný v miligramových množstvách a stabilný v určitom rozsahu koncentrácií.

Bolo by výhodné, keby bolo možné produkovať rekombinantný TCR vo forme nenaviazanej na membránu (alebo rozpustnej forme) nie len na účely skúmania špecifických TCR-pMHC interakcií, ale aj ako diagnostický nástroj na detekciu infekcie alebo na detekciu markerov autoimunitných ochorení alebo na detekciu účinnosti T bunkových vakcín. Rozpustný TCR by bol použiteľný aj na farbenie, napríklad na farbenie buniek, aby sa zistila prítomnosť konkrétneho vírusového antigénu prezentovaného v kontexte MHC. Podobne, rozpustný TCR by mohol byť použitý na doručenie terapeutického činidla, napríklad cytotoxickej zlúčeniny alebo imunostimulačnej zlúčeniny, do buniek prezentujúcich určitý antigén.

Je ťažké produkovať proteíny, ktoré sú vytvorené s viac ako jednej polypeptidovej podjednotky, a ktoré majú transmembránovú doménu, v rozpustnej forme, pretože v mnohých prípadoch je proteín stabilizovaný jeho transmembránovou oblasťou. To je prípad TCR.

Produkcia rozpustného TCR bola opísaná množstvom skupín len teraz. Vo všeobecnosti, všetky metódy opisujú skrátené formy TCR obsahujúce buď len extracelulárne domény, alebo extracelulárne a cytoplazmatické domény. Takže vo všetkých prípadoch boli z exprimovaného proteínu deletované transmembránové domény. Hoci mnohé publikácie dokazujú, že TCR produkovaný podľa ich metód

môže byť rozpoznávaný TCR-špecifickými protilátkami (z čoho vyplýva, že časť rekombinantného TCR rozpoznávaná protilátkou je správne poskladaná), nikto nebol schopný vyrobiť rozpustný TCR s dobrým výťažkom, ktorý je stabilný v nízkych koncentráciách, a ktorý môže rozpoznávať MHC-peptidové komplexy.

Prvý postup na získanie kryštalizovateľného materiálu využíva expresiu v eukaryotických bunkách, ale je extrémne nákladné produkovať tento materiál (Garcia, Degano a ďalší 1996; Garcia, Scott a ďalší 1996). Iný postup, ktorým sa produkuje kryštalizovateľný materiál, využíva *E. coli* expresný systém podobný systému, ktorý bol predtým použitý pre MHC-peptidové komplexy (Garboczi, Ghosh a ďalší 1996; Garboczi, Utz a ďalší 1996). Ukázalo sa, že spôsob uvedený ako druhý, v ktorom sa exprimujú extracelulárne časti TCR reťazcov useknuté tesne pred cysteínovými zvyškami, ktoré sa podieľajú na vytvorení prepojenia reťazcov prostredníctvom disulfidového mostíka, a následne sa skladajú *in vitro*, je všeobecne použiteľný. Ukázalo sa, že väčšina heterodimérnych TCRs je nestabilná, keď sa produkuje týmto spôsobom, a to kvôli nízkej afinite medzi  $\alpha$  a  $\beta$  reťazcami.

Okrem toho existuje množstvo opisov inžinierskej produkcie rozpustného TCR. Niektoré z nich opisujú len expresiu buď  $\alpha$ , alebo  $\beta$  reťazca TCR, takže získaný proteín si nezachováva schopnosť špecificky viazať MHC-peptid (Calaman, Carson a ďalší 1993; Ishii, Nakano a ďalší 1995). Získali sa kryštály  $\beta$  reťazca bez  $\alpha$  reťazca, buď samostatné, alebo naviazané na superantigén (Boulot, Bentley a ďalší 1994; Bentley, Boulot a ďalší 1995; Fields, Malchiodi a ďalší 1996).

Iné publikácie opisujú spôsoby expresie heterodimérnych  $\gamma/\delta$  alebo  $\alpha/\beta$  TCR (Gregoire, Rebai a ďalší 1991; Necker, Rebai a ďalší 1991; Eilat, Kikuchi a ďalší 1992; Weber, Traunecker a ďalší 1992; Corr, Slanetz a ďalší 1994; Ishii, Nakano a ďalší 1995; Gregoire, Malissen a ďalší 1996; Romagne, Peyrat a ďalší 1996). V iných prípadoch sa TCR exprimoval ako jednoreťazcový fúzovaný proteín (Brocker, Peter a ďalší 1993; Gregoire, Malissen a ďalší 1996; Schlueter, Schodin a ďalší 1996). Inou stratégiou bolo exprimovať TCR reťazce ako chimérne proteíny fúzané na Ig pántovú a konštantnú oblasť (Eilat, Kikuchi a ďalší 1992; Weber, Traunecker a ďalší 1992). Iné chimérne TCR proteíny sa exprimovali s umelými

sekvenciami, ktoré vytvárajú stočené závit, ktoré majú vysokú vzájomnú afinitu a špecificitu, takže stabilizujú TCR  $\alpha$ - $\beta$  kontakty a zvyšujú rozpustnosť. Tento prístup použili Chang, Bao a ďalší (1994), ktorí nahradili transmembránovú oblasť proteínu proteínom leucínového zipsu, ktorý pozostáva z dvoch syntetických peptidových sekvencií, kyslého peptidu a zásaditého peptidu, ktoré špecificky interagujú, čím vytvárajú heterodimérny stočený závit. Na vylučovanie heterodimérneho TCR proteínu autori použili bakulovírusový expresný systém v eukaryotických bunkách. Peptidy umelého leucínového zipsu napomáhajú heterodimerizácii TCR  $\alpha$  a  $\beta$  reťazcov, ktoré sú spojené aj medzireťazcovou disulfidovou väzbou tesne nad miestom fúzie so zipsovými peptidmi. Avšak tieto techniky sa doteraz nepotvrdili ako úspešné a neexistuje žiadny dôkaz, že opísaný rozpustný TCR môže rozoznávať TCR ligand. Podobne, Golden, Khandekar a ďalší (1997) opísali produkciu heterodimérnych T bunkových receptorov ako leucínových zipsových fúzovaných proteínov. Rozpustný TCR sa exprimoval v *E. coli* ako sekretovaný heterodimér s  $\alpha$ - $\beta$  medzireťazcovou disulfidovou väzbou ako v Chang a ďalší. Tiež neexistuje žiadny dôkaz, že tento neposkladaný TCR heterodimér je schopný interagovať so svojim ligandom.

Preto existuje potreba rozpustnej verzie na membránu naviazaného TCR, ktorá by bola správne poskladaná tak, že TCR by bol schopný rozoznávať svoj prirodzený ligand. Užitočná by bola aj rozpustná forma TCR, ktorá je stabilná určitú dobu a spôsob jej produkcie v rozumných množstvách. Cieľom predloženého vynálezu je splniť niektoré alebo všetky tieto požiadavky.

### Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je preskladaný rekombinantný T bunkový receptor (TCR), ktorý obsahuje:

i) rekombinantnú TCR  $\alpha$  alebo  $\gamma$  reťazcovú extracelulárnu doménu, ktorá obsahuje prvý heterológny C-koncový dimerizačný peptid; a



ii) rekombinantnú TCR  $\beta$  alebo  $\delta$  reťazcovú extracelulárnu doménu, ktorá obsahuje druhý C-koncový dimerizačný peptid, ktorý vytvára špecifický heterodimér s prvým dimerizačným peptidom, čím sa vytvorí heterodimerizačná doména.

TCR podľa vynálezu, ktorý je preskladaný potom ako sa exprimuje, a nie je vylučovaný ako heterodimér, je konformačne vynikajúci v porovnaní s predtým dostupným rozpustným TCR. To vyplýva z jeho schopnosti rozoznávať MHC-peptidové komplexy. Je tiež stabilný pri relatívne nízkych koncentráciách. Môže byť stabilný pri koncentráciách nižších ako 1 mg/ml a výhodne približne 10  $\mu$ g/ml.

Ďalšie uskutočnenie vynálezu poskytuje biologicky aktívny rekombinantný T bunkový receptor (TCR), ktorý obsahuje:

- i) rekombinantnú TCR  $\alpha$  alebo  $\gamma$  reťazcovú extracelulárnu doménu, ktorá obsahuje prvý heterológny C-koncový dimerizačný peptid; a
- ii) rekombinantnú TCR  $\beta$  alebo  $\delta$  reťazcovú extracelulárnu doménu, ktorá obsahuje druhý C-koncový dimerizačný peptid, ktorý vytvára špecifický heterodimér s prvým dimerizačným peptidom, čím sa vytvorí heterodimerizačná doména. Takýto TCR sa bude špecificky viazať na MHC-peptidové komplexy, výhodne spôsobom podobným prirodzenému TCR, od ktorého je odvodený.

Ďalej vynález poskytuje rekombinantné sekvencie nukleových kyselín, ktoré kódujú tu opísané TCR reťazce. Takéto sekvencie nukleových kyselín sa môžu izolovať z klonov T buniek. Alternatívne sa môžu produkovať synteticky, napríklad zavedením heterológnej sekvencie nukleovej kyseliny do sekvencie nukleovej kyseliny, ktorá kóduje TCR reťazec, alebo mutovaním (inzerciou, deléciou alebo substitúciou) sekvencie nukleovej kyseliny, ktorá kóduje TCR reťazec. Takže vynález zahŕňa vo svojom rámci syntetické peptidy, ktoré sú účinné a/alebo sa špecificky viažu ako prirodzené TCRs.

Ešte iný predmet vynálezu poskytuje spôsob vytvárania rekombinantného T bunkového receptora nenaviazaného na membránu, ktorý zahŕňa:

expresiu rekombinantnej TCR  $\alpha$  alebo  $\gamma$  reťazcovej extracelulárnej domény, ktorá obsahuje prvý heterológny C-koncový dimerizačný peptid, a rekombinantnej TCR  $\beta$  alebo  $\delta$  reťazcovej extracelulárnej domény, ktorá obsahuje druhý C-koncový

dimerizačný peptid, ktorý vytvára špecifický heterodimér s prvým dimerizačným peptidom, čím formuje heterodimerizačnú doménu; a

a vzájomné poskladanie reťazcov *in vitro*, čím sa produkuje TCR heterodimér.

Rekombinantné TCRs podľa vynálezu môžu rozoznávať MHC triedy I-peptidových a MHC triedy II-peptidových komplexov.

Heterodimerizačnou doménou rekombinantného TCR podľa vynálezu je výhodne takzvaný "stočený závit" alebo "leucínový zips". Tieto výrazy sú použité na opísanie párov závitnicových peptidov, ktoré navzájom interagujú špecifickým spôsobom, čím vytvárajú heterodimér. Interakcia nastáva vďaka prítomnosti komplementárnych hydrofóbných zvyškov pozdĺž jednej strany každého zipsového peptidu. Povaha peptidov je taká, že vytváranie heterodimérov je značne výhodnejšie ako vytváranie homodimérov závitníc. Leucínové zipsy môžu byť syntetické alebo prirodzene sa vyskytujúce. Syntetické leucíny môžu byť navrhnuté tak, aby mali vyššiu väzobnú afinitu ako prirodzene sa vyskytujúce leucínové zipsy, čo nemusí byť vždy výhodné. V skutočnosti sú výhodnými leucínovými zipsami na použitie podľa vynálezu prirodzene sa vyskytujúce leucínové zipsy alebo leucínové zipsy s podobnou väzobnou afinitou. Leucínové zipsy z *c-jun* a *c-fos* proteínu sú príkladom leucínových zipsov s vhodnou väzobnou afinitou. Iné vhodné leucínové zipsy zahŕňajú zipsy z *myc* a *max* proteínov (Amati, Dalton a ďalší 1992). Je možné jednoducho navrhnuť aj iné leucínové zipsy s vhodnými vlastnosťami (O'Shea a ďalší 1993).

Výhodné je, aby rozpustné TCRs podľa vynálezu mali leucínové zipsové fúzie s dĺžkou približne 40 aminokyselín zodpovedajúce heterodimerizačným doménam z *c-jun* ( $\alpha$  reťazec) a *c-fos* ( $\beta$  reťazec) (O'Shea, Rutkowski a ďalší 1989, O'Shea, Rutkowski a ďalší 1992, Glover a Harrison 1995). Môžu byť použité dlhšie leucínové zipsy. Keďže je zrejmé, že heterodimerizačná špecifita sa zachováva aj pri dosť krátkych fragmentoch niektorých leucínových zipsových domén (O'Shea, Rutkowski a ďalší 1992), je možné, že podobný účinok je možné dosiahnuť s kratšími *c-jun* a *c-fos* fragmentami. Takéto kratšie fragmenty by mohli mať napríklad



len 8 aminokyselín. Takže dĺžka leucínových zipsových domén môže byť v rozsahu od 8 do 60 aminokyselín.

Molekulové princípy špecificity párovania leucínového zipsu sú dobre charakterizované (Landschulz, Johnson a ďalší 1988; McKnight 1991) a priemerný odborník v oblasti je schopný navrhnuť a skonštruovať leucínové zipsy na vytvorenie homodimérov, heterodimérov alebo trimérnych komplexov (Lumb a Kim 1995; Nautiyal, Woolfson a ďalší 1995; Boice, Dieckmann a ďalší 1996, Chao, Houston a ďalší 1996). Navrhnutie leucínových zipsov alebo iných heterodimerizačných domén s vyššou afinitou ako je afinita *c-jun* a *c-fos* leucínových zipsov môže byť v niektorých systémoch užitočné pre expresiu rozpustných TCRs. Avšak, ako je podrobnejšie uvedené nižšie, keď sa TCR skladá *in vitro*, do skladacieho tlmivého roztoku je výhodne zavedené solubilizačné činidlo, aby sa redukovalo vytváranie neproduktívnych proteínových agregátov. Jednou interpretáciou tohto fenoménu je, že kinetika skladania leucínových zipsových domén je rýchlejšia ako kinetika skladania TCR reťazcov, čo vedie k dimerizácii neposkladaných TCR  $\alpha$  a  $\beta$  reťazcov, a to spôsobuje agregáciu proteínov. Tým že sa spomalí proces skladania a inhibuje sa agregácia pridaním solubilizačného činidla, môže sa proteín udržiavať v roztoku pokiaľ sa úplne neposkladajú obe fúzované domény. Preto heterodimerizačné domény s vyššou afinitou ako *c-fos* a *c-jun* leucínové zipsy môžu vyžadovať vyššie koncentrácie solubilizačného činidla na dosiahnutie výťažku TCRs, ktorý je porovnateľný s výťažkom pri *c-jun* a *c-fos*.

Rôzne biologické systémy používajú rôzne spôsoby na vytváranie stabilných homo- a heteroproteínových dimérov a každý z týchto spôsobov v princípe poskytuje možnosť na skonštruovanie dimerizačných domén v geneticky modifikovaných proteínoch. Leucínové zipsy (Kouzarides a Ziff 1989) sú pravdepodobne najpopulárnejšie dimerizačné moduly a vo veľkej miere boli používané na produkciu geneticky skonštruovaných dimérnych proteínov. Tak bol použitý leucínový zips z GCN4, transkripčného aktivačného proteínu z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, na priamu homodimerizáciu množstva heterológnych proteínov (Hu, Newell a ďalší 1993; Greenfield, Montelione a ďalší 1998). Výhodnou stratégiou je použitie zipsov,

ktoré priamo vytvárajú heterodimérne komplexy, ako Jun/Fos leucínový zipsový pár (de Kruif a Logtenberg 1996; Riley, Ralston a ďalší 1996).

Vo výhodnom rekombinantnom TCR podľa vynálezu chýba medzireťazcová disulfidová väzba, ktorá sa vytvára medzi dvoma cysteínovými zvyškami v prirodzených  $\alpha$  a  $\beta$  TCR reťazcoch a medzi prirodzenými  $\gamma$  a  $\delta$  TCR reťazcami. To sa dá dosiahnuť napríklad fúziou dimerizačných domén do TCR receptorových reťazcov nad cysteínovými zvyškami, takže tieto zvyšky sú z rekombinantného proteínu vylúčené. V alternatívnom prípade sa jeden alebo viacero cysteínových zvyškov nahradí iným aminokyselinovým zvyškom, ktorý nevytvára disulfidovú väzbu. Tieto cysteínové zvyšky nesmú byť prítomné, pretože môžu narušovať *in vitro* skladanie funkčného TCR.

Preskladávanie  $\alpha$  a  $\beta$  reťazcov alebo  $\gamma$  a  $\delta$  reťazcov preskladaného rekombinantného TCR podľa vynálezu sa uskutočňuje *in vitro* v podmienkach vhodných na preskladanie. V konkrétnom uskutočnení sa získa rekombinantný TCR so správnou konformáciou poskladaním rozpustených TCR reťazcov v preskladávacom tlmivom roztoku, ktorý obsahuje solubilizačné činidlo, napríklad močovinu. Výhodne môže byť močovina prítomná v koncentrácii najmenej 0,1 M alebo najmenej 1 M alebo najmenej 2,5 M alebo približne 5 M. Alternatívnym solubilizačným činidlom, ktoré môže byť použité, je guanidín v koncentrácii medzi 0,1 M a 8M, výhodne najmenej 1 M alebo najmenej 2,5 M. Pred preskladaním sa výhodne používa redukčné činidlo na zaistenie úplnej redukcie cysteínových zvyškov. Ak je to nevyhnutné, môžu byť použité ďalšie denaturačné činidlá, ako DTT a guanidín. Pred krokom skladania môžu byť použité rôzne denaturanty a redukčné činidlá (napr. močovina,  $\beta$ -merkaptóetanol). Počas preskladávania môžu byť použité alternatívne redoxné páry, ako cystamín/cyteamín redoxný pár, DTT alebo  $\beta$ -merkaptóetanol/atmosferický kyslík a cysteín v redukovanej a v oxidovanej forme.

Tu opísaný monomérený TCR môže byť značený detegovateľnou značkou, napríklad značkou, ktorá je vhodná na diagnostické účely. Takto vynález poskytuje spôsob na detegovanie MHC-peptidových komplexov, ktorý zahŕňa uvedenie MHC-

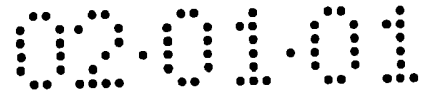


peptidových komplexov do kontaktu s TCR podľa vynálezu, ktorý je špecifický pre daný MHC-peptidový komplex; a detekciu viazania sa TCR na MHC-peptidový komplex. Na poskytnutie detegovateľnej značky môže byť v tetramérom TCR vytvorenom použitím biotinylovaných heterodimérov použitý fluorescenčný streptavidín (komerčne dostupný). Fluorescenčne značený tetramér bude vhodný na použitie vo FACS analýzach, napríklad na detekciu antigén prezentujúcich buniek nesúcich peptid, voči ktorému je TCR špecifický.

Iným spôsobom, ktorým môžu byť detegované rozpustné TCRs, je použitie TCR-špecifických protilátok, najmä monoklonálnych protilátok. Existuje mnoho komerčne dostupných anti-TCR protilátok, ako napríklad  $\beta$ F1 a  $\alpha$ F1, ktoré rozoznávajú konštantné oblasti  $\beta$ , respektíve  $\alpha$  reťazca.

TCR sa môže alternatívne alebo navyše spojiť s terapeutickým činidlom, ktorým môže byť napríklad toxická časť napríklad na použitie na usmrtenie bunky, alebo s imunostimulačným činidlom, ako interleukínom alebo cytokínom. Takto vynález poskytuje spôsob dodania terapeutického činidla do cieľovej bunky, ktorý zahŕňa uvedenie potenciálnych cieľových buniek do kontaktu s TCR podľa vynálezu v podmienkach, ktoré umožňujú pripojenie TCR na cieľovú bunku, pričom uvedený TCR je špecifický pre MHC-peptidové komplexy a je s ním spojené terapeutické činidlo. Najmä by mohol byť rozpustný TCR použitý na doručenie terapeutických činidiel na miesta buniek prezentujúcich konkrétny antigén. Napríklad, toxín by mohol byť doručený do nádoru, a tým by ho pomohol zničiť. To by mohlo byť užitočné v mnohých situáciách a najmä proti nádorom, pretože nie všetky bunky v nádore prezentujú antigény, a preto nie sú všetky nádorové bunky detegované imunitným systémom. S rozpustným TCR by bolo možné doručiť zlúčeninu tak, že by vykonávala svoju funkciu lokálne, ale nie len na bunke, na ktorú sa viaže. Takže v jednej konkrétnej stratégii sa navrhuje pripojenie protinádorových molekúl na T bunkové receptory špecifické pre nádorové antigény.

Na toto použitie by mohli byť využité mnohé toxíny, napríklad rádioaktívne zlúčeniny, enzýmy (napríklad perforín) alebo chemoterapeutické činidlá (napríklad *cis*-platín). Na zaistenie toho, že toxín bude účinkovať v požadovanej lokalite, mohol



by byť vo vnútri lipozómu spojený so streptavidínom, takže zlúčenina by sa vylučovala pomaly. Takto sa predíde poškodzujúcim účinkom počas transportu v tele a zaistí sa, že toxín bude mať maximálny účinok po naviazaní sa TCR na relevantnú antigén prezentujúcu bunku.

Alternatívnym spôsobom značenia alebo pripojenia inej časti, ako napríklad toxickej časti, na rozpustný TCR je zahrnutie značky alebo inej časti do zmiešanej molekuly multiméru. Príkladom takejto multimérnej molekuly je tetramér obsahujúci tri TCR molekuly a jednu molekulu peroxidázy. To by bolo možné dosiahnuť zmiešaním TCR a enzýmu v molárnom pomere 3:1, čím by sa generovali tetramérne komplexy, a izoláciou požadovaného komplexu od komplexov, ktoré neobsahujú správny pomer molekúl. Zmiešané molekuly by mohli obsahovať akúkoľvek kombináciu molekúl s podmienkou, že priestorová zábrana neprekáža alebo význame neprekáža požadovanej funkcii molekúl. Pre zmiešané tetraméry je vhodné umiestnenie väzobných miest na molekule streptavidínu, pretože potom nie je pravdepodobné, že by sa vyskytla priestorová prekážka.

Výhodne obsahujú rekombinantné TCR reťazce podľa vynálezu flexibilný spojovník, ktorý je umiestnený medzi TCR doménou a dimerizačným peptidom. Vhodné spojovníky zahŕňajú štandardné peptidové spojovníky obsahujúce glycín, napríklad spojovníky obsahujúce glycín a serín. Za výhodné sa považuje skrátenie na C-konci blízko cysteínových zvyškov vytvárajúcich medzireťazcovú disulfidovú väzbu, pretože prostredníctvom týchto zvyškov sú  $\alpha$  a  $\beta$  reťazce blízko seba v bunkových TCRs. Preto na poskytnutie nepoškodzujúcej tranzície z TCR reťazcov do heterodimerizačnej domény môžu byť potrebné len relatívne krátke spojovníkové sekvencie. Výhodné je ako spojovníkovú sekvenciu použiť Pro-Gly-Gly alebo Gly-Gly. Avšak spojovníková sekvencia môže variovať. Napríklad, spojovník môže úplne chýbať alebo môže byť redukovaný na jediný zvyšok, v takom prípade je výhodnou voľbou jeden glycínový zvyšok. Pravdepodobne budú tolerované aj varianty dlhších spojovníkov v rozpustnom TCR, s podmienkou, že budú chránené voči útoku proteázy, ktorý by viedol segregácii dimerizačných peptidov od extracelulárnych domén TCR, čo by spôsobilo stratu  $\alpha$ - $\beta$  reťazcovej stability.

Rozpustným TCR podľa vynálezu nemusí nevyhnutne byť  $\alpha$ - $\beta$ TCR. Zahrnuté sú aj molekuly ako  $\gamma$ - $\delta$ ,  $\alpha$ - $\delta$  a  $\gamma$ - $\beta$ TCR molekuly, ako aj TCR molekuly (pre-TCR) obsahujúce invariantné  $\alpha$  reťazce, ktoré sú exprimované len v skorom štádiu vývinu. Pre-TCR špecifikuje bunkovú líniu, ktorá bude exprimovať  $\alpha$ - $\beta$  T bunkový receptor, na rozdiel od tých buniek, ktoré budú exprimovať  $\gamma$ - $\delta$  T bunkový receptor (pozri zhrnutie Aifantis, Azogui a ďalší 1998; von Boehmer, Aifantis a ďalší 1998; Wurch, Biro a ďalší 1998). Pre-TCR sa exprimuje ako TCR  $\beta$  reťazec spárovaný s invariantným Pre-TCR  $\alpha$  reťazcom (Saint Ruf, Ungewiss a ďalší 1994; Wilson a MacDonald 1995), čo zrejme priraduje bunku k  $\alpha$ - $\beta$  T bunkovej línii. Preto sa myslí, že Pre-TCR je dôležitý počas týmusového vývinu (Ramiro, Trigueros a ďalší 1996).

Ak je to vhodné, môžu sa uskutočniť štandardné modifikácie rekombinantných proteínov podľa vynálezu. Tieto modifikácie zahŕňajú napríklad zámenu nespárovaného cysteínového zvyšku v konštantnej oblasti  $\beta$  reťazca, aby sa zabránilo nesprávnemu spárovaniu vo vnútri reťazca alebo medzi reťazcami.

Signálny peptid môže chýbať, pretože neslúži v zrelom receptore žiadnemu účelu, ani nemá schopnosť viazať ligand, a môže v skutočnosti brániť TCR, aby bol schopný rozoznávať ligand. Vo väčšine prípadov sa predpokladá miesto štiepenia, v ktorom sa signálny peptid odstraňuje zo zreých TCR reťazcov, ale nie je experimentálne stanovené. Skonštruovanie exprimovaných TCR reťazcov tak, aby boli na N-konci o maximálne 10 aminokyselín dlhšie alebo kratšie, nemá žiadny význam pre funkciu rozpustného TCR. Bolo by možné pridať určité prídavky, ktoré nie sú prítomné v pôvodnej proteínovej sekvencii. Napríklad by bolo možné pridať krátku priveskovú sekvenciu, ktorá by pomohla pri purifikácii TCR reťazcov, za predpokladu, že nebude interferovať so správnou štruktúrou a skladaním antigén väzobného miesta TCR.

Na expresiu v *E. coli* môže byť na N-koniec štartovacieho miesta predpokladanej zrelej proteínovej sekvencie zavedený metionínový zvyšok, aby bolo možné iniciovať transláciu.

Zďaleka nie všetky zvyšky variabilných domén TCR reťazcov sú kľúčové pre antigénovú špecificitu a funkciu. Preto je možné do tejto oblasti zaviesť značné množstvo mutácií bez toho, aby sa ovplyvnila špecificita a funkcia antigénu.

Naopak, určité zvyšky, ktoré sa podieľajú na vytváraní kontaktov s peptidovým antigénom alebo polypeptidom HLA ťažkého reťazca, tzn. zvyškami tvoriacimi CDR oblasti TCR reťazcov, môžu byť substituované zvyškami, ktoré by zvýšili afinitu TCR voči ligandu. Takéto substitúcie, berúc do úvahy nízku afinitu väčšiny TCRs voči peptid-MHC ligandom, by mohli byť užitočné na zosilnenie špecificity a funkčného potenciálu rozpustných TCRs. V tu uvedených príkladoch sú stanovené afinity rozpustných TCRs pre peptid-MHC ligandy. Takéto merania sa môžu použiť na testovanie mutácií zavedených do TCR, a tak aj na identifikáciu TCRs obsahujúcich substitúcie, ktoré zosilňujú aktivitu TCR.

Zďaleka nie všetky zvyšky v konštantných doménach TCR reťazcov sú nevyhnutné pre špecificitu a funkciu antigénu. Takže do tejto oblasti ovplyvňujúcej antigénovú špecificitu môže byť zavedené značné množstvo mutácií. V príklade 14 uvedenom nižšie sme ukázali, že dve aminokyselinové substitúcie v konštantnej doméne TCR  $\beta$  reťazca nemajú žiadne detegovateľné vplyvy na schopnosť TCR viazať HLA-peptidový ligand.

TCR  $\beta$  reťazec obsahuje cysteínový zvyšok, ktorý nie je spárovaný v bunkovom alebo prirodzenom TCR. Mutácia tohto zvyšku zosilňuje účinnosť *in vitro* preskladania rozpustného TCR. Substitúcie tohto cysteínového zvyšku za serín alebo alanín majú významný pozitívny účinok na účinnosť preskladania *in vitro*. Podobné pozitívne účinky, alebo ešte lepšie účinky, je možné dosiahnuť substitúciami za iné aminokyseliny.

Ako bolo uvedené vyššie, je výhodné, aby chýbali cysteínové zvyšky vytvárajúce medzireťazcovú disulfidovú väzbu v prirodzenom TCR, aby sa zabránilo problémom pri preskladávaní. Avšak, keďže umiestnenie týchto cysteínových zvyškov je prirodzeným dizajnom v TCR, a keďže sa aj ukázalo, že TCR s takto umiestnenými cysteínovými zvyškami je funkčné pri *c-jun* a *c-fos* leucínových

zipsových doménach (O'Shea a ďalší, 1989), mohli by byť tieto cysteínové zvyšky prítomné, za predpokladu, že TCR by sa mohol preskladať.

Keďže konštantné domény sa priamo nepodieľajú na kontaktoch s peptid-MHC ligandami, C-koncové miesto skrátene sa môže meniť v podstate bez straty funkcie. Napríklad by malo byť možné produkovať funkčné rozpustné TCRs bez celej konštantnej domény. V princípe by bolo jednoduchšie exprimovať a skladať rozpustné TCRs obsahujúce len variabilné oblasti alebo variabilné oblasti a len krátky fragment konštantných oblastí, pretože polypeptidy by boli kratšie. Avšak táto stratégia nie je výhodná. A to preto, že by sa skomplikovala podmienka ďalšej stability  $\alpha$ - $\beta$  reťazcového párovania cez heterodimerizačnú doménu, pretože skonštruované C-konce dvoch reťazcov by boli vzdialené, čo by vyžadovalo dlhé spojovníkové sekvencie. Výhodou heterodimerizačných domén fúzovaných tesne pred polohou cysteínou vytvárajúcich medzireťazcovú disulfidovú väzbu je, že v bunkovom receptore sú  $\alpha$  a  $\beta$  reťazce držané veľmi blízko seba. Preto je menej pravdepodobné, že by fúzia v tomto mieste spôsobila deformovanie TCR štruktúry.

Je možné, že by bolo možné produkovať funkčný rozpustný TCR s väčším fragmentom konštantných domén, ako je tu uvedené ako výhodné, to znamená, že konštantné domény nemusia byť skrátene tesne pred cysteínmi vytvárajúcimi medzireťazcovú disulfidovú väzbu. Zahrnutá môže byť napríklad celá konštantná doména okrem transmembránovej domény. V takom prípade by bolo výhodné mutovať cysteínové zvyšky vytvárajúce medzireťazcovú disulfidovú väzbu v bunkovom TCR.

Okrem toho, by na podporu medzireťazcovej stability prostredníctvom heterodimerizačnej domény mohlo byť použité zavedenie cysteínových zvyškov, ktoré by mohli vytvárať medzireťazcovú disulfidovú väzbu. Jednou možnosťou by mohlo byť skrátene  $\alpha$  a  $\beta$  reťazcov blízko cysteínových zvyškov vytvárajúcich medzireťazcovú disulfidovú väzbu bez toho, aby sa odstránili, takže by mohlo nastať normálne vytvorenie disulfidovej väzby. Inou možnosťou by mohlo byť deletovanie len transmembránových domén  $\alpha$  a  $\beta$  reťazcov. Ak by sa exprimovali kratšie fragmenty  $\alpha$  a  $\beta$  reťazcov, mohli by byť cysteínové zvyšky zavedené ako substitúcie

v aminokyselinových polohách, v ktorých by pri skladaní dvoch reťazcov dochádzalo k ich tesnému priblíženiu, ktoré by bolo vhodné na vytvorenie disulfidovej väzby.

Purifikáciu TCR je možné dosiahnuť rôznymi prostriedkami. Je možné využiť alternatívne spôsoby iónovej výmeny alebo je možné použiť iné spôsoby purifikácie proteínu, ako napríklad gélovú filtračnú chromatografiu alebo afinitnú chromatografiu.

V spôsobe produkcie rekombinantného TCR podľa vynálezu je možné zvýšiť účinnosť skladania aj pridaním určitých iných proteínových zložiek, napríklad šaperonínových proteínov, do skladacej zmesi. Zlepšenie skladania sa dosiahlo prechodom proteínu cez kolónu s imobilizovanými mini-šaperonínmi (Altamirano, Golbik a ďalší 1997; Altamirano, Garcia a ďalší 1999).

Okrem spôsobov opísaných v príkladoch sú možné aj alternatívne prostriedky biotinylácie TCR. Použitá môže byť napríklad chemická biotinylácia. Použité môžu byť alternatívne biotinylačné privesky, hoci určité aminokyseliny v sekvencii biotínového privesku sú esenciálne (Schatz a ďalší 1993). Aj zmes používaná na biotinyláciu môže byť rôzna. Enzým vyžaduje Mg-ATP a nízku iónovú silu, hoci obe tieto podmienky môžu varírovať, napr. môže sa použiť vyššia iónová sila a dlhší reakčný čas. Môže sa použiť iná molekula ako avidín alebo streptavidín na vytvorenie multimérov TCR. Vhodná by bola akákoľvek molekula, ktorá viaže biotín multivalentným spôsobom. Alternatívne by bolo možné použiť úplne iné spojenie (ako napríklad poly-histidínový privesok na chelatovanom ióne niklu (Quiagen Product Guide 1999, Kapitola 3 "Protein Expression, Purification, Detection and Assay" str. 35-37). Výhodne sa privesok nachádza smerom k C-koncu proteínu, tak, aby sa minimalizoval rozsah priestorového prekážania v interakcii s potenciálnymi peptid-MHC komplexami.

Príklady vhodných MHC-peptidových cieľov pre TCR podľa vynálezu zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na, vírusové epitopy, ako napríklad HTLV-1 epitopy (napr. Tax peptid obmedzený prostredníctvom HLA-A2; HTLV-1 je asociovaný s leukémiou), HIV epitopy, EBV epitopy, CMV epitopy; melanómové

epitopy a iné rakovinovo-špecifické epitopy; a epitopy asociované s autoimunitnými poruchami, ako napríklad reumatoidnou artritídou.

Liečba veľkého množstva chorôb môže byť potenciálne zosilnená umiestnením liečiva prostredníctvom špecificity rozpustných TCRs.

Vírusové ochorenia, pre ktoré existujú liečivá, napr. HIV, SIV, EBV, CMV, by mohli profitovať z vylučovania liečiva v tesnej blízkosti infikovaných buniek. Pri rakovine by lokalizácia v blízkosti nádorov alebo metastáz zosilnila účinok toxínov alebo imunostimulátorov. Pri autoimunitných ochorenia by mohli byť imunosupresívne liečivá vylučované pomaly, čím by mali lokálnejší účinok počas dlhšej doby s minimálnym ovplyvňovaním celkovej imunitnej kapacity subjektu. Pri prevencii odvrhnutia štepu by rovnakým spôsobom mohol byť optimalizovaný účinok imunosupresívnych liečiv. Na podanie vakcíny by mohol byť vakcínový antigén lokalizovaný v blízkosti antigén prezentujúcich buniek, a tak by sa zosilnila účinnosť antigénu. Spôsob sa môže aplikovať aj na účely zobrazovania.

Výhodné znaky každého uskutočnenia vynálezu sú v každom ohľade *mutatis mutandis*. Tu citované dokumenty predchádzajúceho stavu techniky sú v rozsahu vynálezu zahrnuté kompletne v rozsahu umožnenom zákonom.

Vynález bude nižšie opísaný v nasledujúcich príkladoch, ktoré neobmedzujú žiadnym spôsobom rozsah vynálezu.

### Prehľad obrázkov na výkresoch

Opis sa odvoláva na nasledujúce priložené obrázky.

Obrázok 1 je schematický pohľad na proteín, ktorý je tvorený T bunkovým receptorom fúzovaným s leucínovým zipsom. Každý reťazec pozostáva z domén imunoglobulínovej superrodiny, jednej variabilnej (V) a jednej konštantnej (C). Konštantné domény sú skrátané hneď na N-konci medzireťazcových cystetínových zvyškov, a sú fúzované s leucínovým zipsovým heterodimerizačným motívom z *c-Jun* ( $\alpha$ ) alebo *c-Fos* ( $\beta$ ) s dĺžkou približne 40 aminokyselín na C-konci prostredníctvom krátkeho spojovníka.  $\alpha$ -Jun aj  $\beta$ -Fos obsahujú dve medzireťazcové

disulfidové väzby a párujú sa len prostredníctvom nekovalentných kontaktov. Alfa reťazec je kratší ako beta reťazec kvôli kratšej konštantnej doméne.

Obrázok 2 je fotografia redukčnej/neredukčnej gélovej analýzy heterodimérneho JM22zip receptora. Identické vzorky purifikovaného TCR-zipsu sa naniesli na 15% akrylamidový SDS gél, buď v redukujúcich podmienkach (dráha 2) alebo v neredukujúcich podmienkach (dráha 4). V dráhach 1 a 3 sú markerové proteíny. Molekulové hmotnosti sú uvedené v kilodaltonoch. Pri oboch podmienkach nekovalentne spojený heterodimér disociuje na  $\alpha$  a  $\beta$  reťazce. V dráhe 4 sa každý reťazec pohybuje s väčšou mobilitou a jednotlivé pásy indikujú prítomnosť jednotlivých druhov medzireťazcovej disulfidovej väzby. To je kompatibilné s vytváraním správnej disulfidovej väzby.

Obrázok 3 je graf znázorňujúci špecifické viazanie sa JM22zip TCR na HLA-A2 Flu matricové (M58-66) komplexy. HLA-A2 komplexy, preskladané okolo jednotlivých peptidov a biotinylované na  $\beta$ 2-mikroglobulíne sa imobilizovali na troch streptavidínom pokrytých tečúcich bunkách: 3770 rezonančných jednotiek (RU) HLA-A2 POL ako kontrola na tečúcich bunkách (FC) 3, a dve odlišné úrovne HLA-A2 M58-66 FLU (2970 RU na FC1 a 4960 RU na FC2). JM22zip sa injekčne zavádzal v rozpustnej fáze postupne na všetky tri tečúce bunky v koncentrácii 43  $\mu$ M 60 sekúnd. Počas injekcie sa pozoruje vzrast nad pozadie pri odpovedi na obe HLA-A2 FLU-pokryté tečúce bunky. Približne 1000 RU špecifického viazania sa JM22zip na tečúce bunky 1 a približne 700 RU na tečúce bunky 2.

Obrázok 4 znázorňuje sekvencie syntetických DNA primerov použitých na "ukotvenie" amplifikácie TCR génov. Rozoznávacie miesta pre DNA restriktčné enzýmy použité na klonovanie sú podčiarknuté. A: poly-C"ukotvovací primer". B: Primer špecifický pre konštantnú oblasť TCR  $\alpha$  reťazca. C: Primer špecifický pre konštantnú oblasť TCR  $\beta$  reťazca.

Obrázok 5 znázorňuje sekvencie syntetických DNA primerov použité na PCR amplifikáciu DNA fragmentov kódujúcich 40 aminokyselín oblastí stočeného závitú (leucínového zipsu) *c-jun* a *c-fos*. Rozoznávacie miesta pre DNA restriktčné enzýmy

použité na klonovanie sú podčiarknuté. A: *c-jun* 5' primer. B: *c-jun* 3' primer. C: *c-fos* 5' primer. D: *c-fos* 3' primer.

Obrázok 6 znázorňuje zodpovedajúce DNA a aminokyselinové (jedno-písmenový kód) sekvencie *c-fos* a *c-jun* fragmentov, ako sú fúzované s TCRs (zavedené v pBJ107 a pBJ108). A: *c-jun* leucínový zips, ako je fúzovaný s TCR  $\alpha$  reťazcami. B: *c-fos* leucínový zips, ako je fúzovaný s TCR  $\beta$  reťazcami.

Obrázok 7 znázorňuje sekvencie syntetických DNA primerov použitých na mutovanie nespárovaného cysteínového zvyšku v TCR  $\beta$  reťazcoch. Primery boli navrhnuté použitím "Quickchange™" metódy mutagenézy (Stratagene). A: Mutácia cysteínu na serín, priamy (sense) primer, uvedená aminokyselinová sekvencia a označená mutácia. B: Mutácia cysteínu na serín, protismerný (nonsense) primer. C: Mutácia cysteínu na alanín, priamy (sense) primer, uvedená aminokyselinová sekvencia a označená mutácia. D: Mutácia cysteínu na alanín, protismerný (nonsense) primer.

Obrázok 8 je schematickým znázornením TCR-zipsového fúzovaného proteínu. Štyri imunoglobulínové domény sú znázornené ako polkruhy, pričom sú vyznačené vnútroreťazcové disulfidové mostíky medzi prislúchajúcimi párami cysteínových zvyškov. Čísla označujú polohy aminokyselín v zreloch T-bunkových receptorových reťazcoch. Kvôli miernym rozdielom v dĺžke reťazca po rekombinácii môžu byť dĺžky reťazcov v rôznych TCRs mierne odlišné. Zvyšky zavedené v spojovníkovej sekvencii sú označené jednopísmenovým kódom.

Obrázok 9 znázorňuje sekvencie syntetických DNA primerov použité na PCR amplifikáciu TCR  $\alpha$  a  $\beta$  reťazcov. Rozoznávacie miesta pre DNA restriktčné enzýmy sú podčiarknuté a aminokyselinové sekvencie zodpovedajúce príslušným TCR reťazcom sú uvedené nad sekvenciami priamych primerov. Malými písmenami sú uvedené tiché DNA mutácie týkajúce sa TCR génových sekvencií a iné DNA sekvencie, ktoré nezodpovedajú TCR génom. A: 5' PCR primer pre ľudský V $\alpha$ 10.2 JM22 TCR reťazec, ktorý je definovaný Influenza matricovým vírusovým peptidom prezentovaným na HLA-A0201. B: 5' PCR primer pre ľudský V $\beta$ 17 JM22 TCR reťazec, ktorý je definovaný Influenza matricovým vírusovým peptidom

prezentovaným na HLA-A0201. C: 5' PCR primer pre myšací V $\alpha$ 4 TCR reťazec, ktorý je definovaný Influenza nukleoproteínovým peptidom prezentovaným na H2-D<sup>b</sup>. D: 5' PCR primer pre myšací V $\beta$ 11 TCR reťazec, ktorý je definovaný Influenza nukleoproteínovým peptidom prezentovaným na H2-D<sup>b</sup>. E: 5' PCR primer pre ľudský V $\alpha$ 23 TCR reťazec, ktorý je definovaný 003 HIV-1 Gag peptidom prezentovaným na HLA-A0201. F: 5' PCR primer pre ľudský V $\beta$ 5.1 TCR reťazec, ktorý je definovaný 003 HIV-1 Gag peptidom prezentovaným na HLA-A0201. G: 5' PCR primer pre ľudský V $\alpha$ 2.3 A6 TCR reťazec, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax peptidom prezentovaným na HLA-A0201. H: 5' PCR primer pre ľudský V $\beta$ 12.3 A6 TCR reťazec, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax peptidom prezentovaným na HLA-A0201. I: 5' PCR primer pre ľudský V $\alpha$ 17.2 reťazec B7 TCR, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax peptidom prezentovaným na HLA-A0201. J: 5' PCR primer pre ľudský V $\beta$ 12.3 B7 TCR reťazec, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax peptidom prezentovaným na HLA-A0201. K: 3' PCR primer pre ľudské C $\alpha$  reťazce, všeobecne použiteľný. L: 3' PCR primer pre ľudské C $\beta$  reťazce, všeobecne použiteľný.

Obrázok 10 znázorňuje predpokladanú proteínovú sekvenciu (jednopísmenový kód hore) a DNA sekvenciu (spodná) rozpustného TCR  $\alpha$  reťazca z JM22, ktorý je definovaný flu matricovým proteínom prezentovaným na HLA-A2, ako je fúzovaná s *c-jun* doménou "leucínového zipsu". Mutácie zavedené na 5' koniec DNA sekvencie na zosilnenie expresie génu v *E. coli* sú označené malými písmenami, ako aj sekvencia spojovníka medzi TCR a *c-jun* sekvenciami.

Obrázok 11 znázorňuje predpokladanú proteínovú sekvenciu (jednopísmenový kód hore) a DNA sekvenciu (spodná) rozpustného TCR  $\beta$  reťazca z JM22, ktorý je definovaný flu matricovým proteínom prezentovaným na HLA-A2, ako je fúzovaná s *c-fos* doménou "leucínového zipsu". Sekvencia spojovníka medzi TCR a *c-fos* sekvenciami je označená malými písmenami.

Obrázok 12 znázorňuje predpokladanú proteínovú sekvenciu (jednopísmenový kód hore) a DNA sekvenciu (spodná) rozpustného TCR  $\alpha$  reťazca z hlodavčieho F5 receptora, ktorý je definovaný Influenza vírusovým nukleoproteínom prezentovaným na H2-D<sup>b</sup>, ako je fúzovaná s *c-jun* doménou "leucínového zipsu".

Mutácie zavedené na 5' koniec DNA sekvencie na zosilnenie expresie génu v *E. coli* sú označené malými písmenami, ako aj sekvencia spojovníka medzi TCR a *c-jun* sekvenciami.

Obrázok 13 znázorňuje predpokladanú proteínovú sekvenciu (jednopísmenný kód hore) a DNA sekvenciu (spodná) rozpustného TCR  $\beta$  reťazca z hlodavčieho F5 receptora, ktorý je definovaný Influenza vírusovým nukleoproteínom prezentovaným na H2-D<sup>b</sup>, ako je fúzovaná s *c-fos* doménou "leucínového zipsu". Sekvencia spojovníka medzi TCR a *c-fos* sekvenciami je označená malými písmenami.

Obrázok 14 znázorňuje predpokladanú proteínovú sekvenciu (jednopísmenný kód hore) a DNA sekvenciu (spodná) rozpustného TCR  $\alpha$  reťazca od pacienta 003, ktorý je definovaný HIV-1 Gag prezentovaným na HLA-A2, ako je fúzovaná s *c-jun* doménou "leucínového zipsu". Mutácie zavedené na 5' koniec DNA sekvencie na zosilnenie expresie génu v *E. coli* sú označené malými písmenami, ako aj sekvencia spojovníka medzi TCR a *c-jun* sekvenciami.

Obrázok 15 znázorňuje predpokladanú proteínovú sekvenciu (jednopísmenný kód hore) a DNA sekvenciu (spodná) rozpustného rozpustného TCR  $\beta$  reťazca od pacienta 003, ktorý je definovaný HIV-1 Gag prezentovaným na HLA-A2, ako je fúzovaná s *c-fos* doménou "leucínového zipsu". Sekvencia spojovníka medzi TCR a *c-fos* sekvenciami je označená malými písmenami.

Obrázok 16 znázorňuje predpokladanú proteínovú sekvenciu (jednopísmenný kód hore) a DNA sekvenciu (spodná) rozpustného TCR  $\alpha$  reťazca z klonu A6, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax prezentovaným na HLA-A2 (Garboczi, Utz a ďalší, 1996; Garboczi, Ghosh a ďalší 1996), ako je fúzovaná s *c-jun* doménou "leucínového zipsu". Mutácie zavedené na 5' koniec DNA sekvencie na zosilnenie expresie génu v *E. coli* sú označené malými písmenami, ako aj sekvencia spojovníka medzi TCR a *c-jun* sekvenciami.

Obrázok 17 znázorňuje predpokladanú proteínovú sekvenciu (jednopísmenný kód hore) a DNA sekvenciu (spodná) rozpustného TCR  $\beta$  reťazca z klonu A6, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax na HLA-A2 (Garboczi, Utz a ďalší, 1996; Garboczi,

Ghosh a ďalší 1996), ako je fúzovaná s *c-fos* doménou "leucínového zipsu" a biotinylačným príveskom, ktorý slúži ako substrát pre BirA (Barker a Campbell, 1981; Barker a Campbell, 1981; Howard, Shaw a ďalší 1985; Schatz, 1993; O'Callaghan, Byford 1999). Sekvencia spojovníka medzi TCR a *c-fos* sekvenciami je označená malými písmenami. Mutácia DNA sekvencie, ktorou je substituovaný cysteínový zvyšok za alanínový zvyšok, je vytlačená hrubo a podčiarknutá.

Obrázok 18 znázorňuje predpokladanú proteínovú sekvenciu (jednopísmenný kód hore) a DNA sekvenciu (spodná) rozpustného TCR  $\alpha$  reťazca z klonu M10B7/D3, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax prezentovaným na HLA-A2 (Ding a ďalší 1998), ako je fúzovaná s *c-jun* doménou "leucínového zipsu". Sekvencia spojovníka medzi TCR a *c-jun* sekvenciami je označená malými písmenami.

Obrázok 19 znázorňuje predpokladanú proteínovú sekvenciu (jednopísmenný kód hore) a DNA sekvenciu (spodná) rozpustného TCR  $\beta$  reťazca z klonu M10B7/D3, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax prezentovaným na HLA-A2 (Ding a ďalší 1998), ako je fúzovaná s *c-fos* doménou "leucínového zipsu" a biotinylačným príveskom, ktorý slúži ako substrát pre BirA. Sekvencia spojovníka medzi TCR a *c-fos* sekvenciami je označená malými písmenami. Mutácia DNA sekvencie, ktorou je substituovaný cysteínový zvyšok za alanínový zvyšok, je vytlačená hrubo a podčiarknutá. Malými písmenami sú označené aj dve tiché mutácie (P-G kodóny) zavedené za účelom klonovania a na odstránenie *Xma*I restričného miesta.

Obrázok 20 znázorňuje predpokladanú proteínovú sekvenciu (jednopísmenný kód hore) a DNA sekvenciu (spodná) mutovaného rozpustného TCR  $\beta$  reťazca z klonu A6, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax prezentovaným na HLA-A2 (Garboczi, Utz a ďalší, 1996; Garboczi, Ghosh a ďalší 1996), ako je fúzovaná s *c-fos* doménou "leucínového zipsu" a biotinylačným príveskom, ktorý slúži ako substrát pre BirA (Barker a Campbell, 1981; Barker a Campbell, 1981; Howard, Shaw a ďalší 1985; Schatz, 1993; O'Callaghan, Byford 1999). Sekvencia spojovníka medzi TCR a *c-fos* sekvenciami je označená malými písmenami. Mutácia DNA sekvencie, ktorou je substituovaný cysteínový zvyšok za alanínový zvyšok, je vytlačená hrubo a

podčiarknutá. Hrubo vytlačená a podčiarknutá je aj substitúcia asparagínového zvyšku za kyselinu asparágovú, čo je mutácia v konštantnej oblasti, ktorá nemala žiadny funkčný účinok na rozpustný TCR.

Obrázok 21 znázorňuje predpokladanú proteínovú sekvenciu (jednopísmenný kód hore) a DNA sekvenciu (spodná) *c-fos* - biotinylačného fúzovacieho partnera použitého pre TCR  $\beta$  reťazce. Rozoznávacie miesta pre DNA restriktčné enzýmy sú podčiarknuté a označené sú hranice dvoch fúzovacích domén. Spojovníkové sekvencie sú uvedené malými písmenami.

Obrázok 22 znázorňuje sekvenciu syntetického DNA primeru použitého na PCR amplifikáciu fragmentu V $\beta$ -*c-fos* leucínového zipsu ľudského JM22 Influenza matricový peptid-HLA-A0201 komplexu.

Obrázok 23 znázorňuje sadu fotografií gélov. a Prípravok denaturovaného proteínu TCR špecifického pre 003 HIV gag peptid-HLA-A2 komplex analyzovaný prostredníctvom SDS-PAGE. Dráha 1: markery molekulovej hmotnosti so širokým rozsahom (Bio-Rad), dráhy 2 a 3: baktérie po indukcii proteínovej expresie s 0,5 mM IPTG, dráhy 4 a 5: purifikované inklúzne telieska rozpustené v 6M guanidínovom tlmivom roztoku. b Prípravok denaturovaného TCR s biotínovým prívieskom, ktorý je špecifický pre influenza matricový peptid-HLA-A2 komplex analyzovaný prostredníctvom SDS-PAGE. Dráha 1: markery molekulovej hmotnosti so širokým rozsahom (Bio-Rad), dráhy 2 a 3:  $\alpha$ - a  $\beta$ -reťazcové purifikované inklúzne telieska rozpustené v 6M guanidínovom tlmivom roztoku. c Dráha 1 a 5: markery molekulovej hmotnosti so širokým rozsahom (Bio-Rad), dráhy 2, 3 a 4: expresia  $\alpha$ -,  $\beta$ - a mutantného  $\beta$ -reťazca v baktériách po indukcii proteínovej expresie s 0,5 mM IPTG, dráhy 6, 7 a 8: purifikované inklúzne telieska  $\alpha$ -,  $\beta$ - a mutantného  $\beta$ -reťazca rozpustené v 6M guanidínovom tlmivom roztoku.

Obrázok 24 je chromatogram znázorňujúci elúciu JM22z heterodiméru z POROS 10HQ aniónovej výmennej kolóny. Prerušovaná čiara znázorňuje konduktivitu, z ktorej vyplýva koncentrácia chloridu sodného, neprerušovaná čiara znázorňuje optickú hustotu pri 280 nm, z ktorej vyplýva koncentrácia proteínu v eluáte. Vrcholové proteínové frakcie sa zhromaždili a ďalej analyzovali. Vložený

obrázok znázorňuje chromatogram elúcie purifikovaného JM22z zo Superdex 200 HR kolóny. Šípky označujú kalibráciu kolóny proteínmi so známou molekulovou hmotnosťou. Z porovnania s týmito proteínmi vyplýva, že preskladaný JM22z proteín má molekulovú hmotnosť približne 74 kDA, čo zodpovedá heterodimérnemu proteínu.

Obrázok 25 je fotografia znázorňujúca SDS-polyakrylamidovú gélovú elektroforézu (Coomassie farbená) purifikovaného JM22z proteínu. Dráhy 1 a 3: štandardné proteíny so známou molekulovou hmotnosťou (ako je uvedená), dráha 2: JM22z proteín ošetrený pred nanesením s SDS-vzorkovým tlmivým roztokom obsahujúcim redukčné činidlo (DTT), dráha 4: JM22z proteín ošetrený s SDS vzorkovým tlmivým roztokom bez redukčných činidiel.

Obrázok 26 a Purifikácia preskladaného TCR s biotínovým príveskom, ktorý je špecifický pre influenza matricový peptid-HLA-A2 komplex. i. Chromatogram elúcie proteínu z POROS 10HQ kolóny. Čiara x označuje absorbciu pri 280 nm a čiara y označuje konduktivitu (meranie gradientu chloridu sodného použitého na eluovanie proteínu). Čísla frakcií sú uvedené na vertikálnych čiarach. ii. SDS-PAGE frakcií eluovaných z kolóny ako bolo uvedené v bode i. Dráha 1 obsahuje markery molekulovej hmotnosti so širokým rozsahom (Bio-Rad) a dráhy 2 až 13 obsahujú 5  $\mu$ l frakcií 6 až 15, postupne ako sú uvedené. iii. SDS-PAGE analýza spojených frakcií z bodu i., ktoré obsahujú flu-TCR s biotínovým príveskom. Dráha 1 obsahuje markery molekulovej hmotnosti so širokým rozsahom (Bio-Rad), dráha 2: flu-TCR proteín s biotínovým príveskom. b Purifikácia preskladaného TCR s biotínovým príveskom, ktorý je špecifický pre HTLV-tax peptid-HLA-A2 komplex. i. Chromatogram elúcie proteínu z POROS 10HQ kolóny. Čiara x označuje absorbciu pri 280 nm a čiara y označuje konduktivitu (meranie gradientu chloridu sodného použitého na eluovanie proteínu). Čísla frakcií sú uvedené na vertikálnych čiarach. ii. SDS-PAGE frakcií eluovaných z kolóny ako bolo uvedené v bode i. Dráha 1 obsahuje markery molekulovej hmotnosti so širokým rozsahom (Bio-Rad) a dráhy 2 až 10 obsahujú 5  $\mu$ l frakcií 2 až 11, postupne ako sú uvedené. iii. SDS-PAGE analýza spojených frakcií z bodu i., ktoré obsahujú tax-TCR s biotínovým

príveskom. Dráha 1 obsahuje markery molekulovej hmotnosti so širokým rozsahom (Bio-Rad), dráha 2: tax-TCR proteín s biotínovým príveskom, dráha 3: mutantný tax-TCR proteín s biotínovým príveskom.

Obrázok 27 je chromatogram znázorňujúci elúciu rozpustného TCR s biotínovým príveskom po biotinylácii s BirA enzýmom z Superdex 200 HR kolóny ekvilibrovanej v PBS. Biotinylovaný TCR sa eluuje v približne 15 až 16 minúte a nenaviazaný biotín sa eluuje približne v 21 minúte. Frakcie obsahujúce biotinylovaný rozpustný TCR sa spoja na ďalšie použitie.

Obrázok 28 je sada fotografií gélov. Stanovenie biotinylácie biotinylovaných TCRs. a. SDS-PAGE prípravkov preskladaných TCRs a inklúzných teliesok. Dráha 1: markery molekulových hmotností so širokým rozsahom (Bio-Rad), dráha 2: biotinylovaný flu-TCR, dráha 3: biotinylovaný tax-TCR, dráha 4: biotinylovaný mutantný tax-TCR, dráha 5: HIV gag-TCR (bez biotínového prívesku); b. Western blot rovnakého gélu ako v bode a., s tým rozdielom, že markery so širokým rozsahom boli biotinylované (Bio-Rad). Na znázornenie biotinylovaných proteínov bol použitý avidín-HRP konjugát a vizualizácia sa uskutočnila s Opti-4CN (Bio-Rad).

Obrázok 29 ilustruje viazanie sa JM22z na rôzne HLA-A2-peptidové komplexy. (a vložený obrázok) Špecifická interakcia medzi JM22z a HLA-A2-flu je demonštrovaná porovnaním SPR odpovede TCR na tečúcich bunkách pokrytých s 1900 RU HLA-A2-flu s odpoveďami TCR na tečúcich bunkách, z ktorých jedny sú pokryté so 4200 RU HLA-A2-pol, a druhé so 4300 RU CD5. Odpovede pozadia pri rôznych koncentráciách JM22z sa merali na 1700 RU HLA-A2-pol (a). Hodnota pozadia bola subtrahovaná zo špecifickej odpovede meranej na 1900 RU HLA-A2-flu (b) a bola vynesená do grafu oproti koncentrácii (c).  $K_d$  s hodnotou 13  $\mu\text{M}$ , odhadnutá z nelineárnej krivky, bola v súlade s  $K_d$  s hodnotou 12  $\mu\text{M}$ , ktorá bola vypočítaná na základe Scatchard grafu z rovnakých údajov.

Obrázok 30 je graf znázorňujúci výsledok Biacore 2000™ analýzy prirodzeného a mutantného rozpustného TCR s biotinylovaným príveskom. 5  $\mu\text{l}$  prirodzeného tax TCR s koncentráciou 2,2 mg/ml a potom mutantného tax TCR s koncentráciou 2,4 mg/ml sa spustilo na štyri druhy tečúcich buniek, ktoré mali na

povrchu pripojené nasledujúce proteíny: A: tax-pMHC komplex, B/C: flu-pMHC komplex, D: OX68 kontrolný proteín. Tak prirodzený, ako aj mutálny proteín sa podobne viazali na špecifický pMHC komplex.

Obrázok 31 znázorňuje účinok väzby rozpustného CD8aa na viazanie sa rozpustného TCR na rovnaký HLA-A2-flu komplex. (A) TCR alebo TCR so 120  $\mu$ M rozpustného CD8 sa injekčne nanieslo na kontrolné tečúce bunky pokryté so 4100 RU irelevantného proteínu (CD5) a sondové tečúce bunky pokryté so 4700 RU HLA-A2-flu. Po subtraktovaní pozadia sú znázornené vypočítané hodnoty rovnovážnej odpovede pri rôznych koncentráciách samotného TCR (prázdne krúžky) alebo v kombinácii so 120  $\mu$ M rozpustného CD8 (čierne krúžky). Znáznorená je aj hodnota samotného CD8 (prázdne trojuholníky) a vypočítaný rozdiel medzi TCR + CD8 a samotným TCR (prázdne štvorce). (B) Znáznorená je časová závislosť odpovedí 49  $\mu$ M samotného TCR (prázdne krúžky) alebo v kombinácii so 120  $\mu$ M CD8 (čierne krúžky) na 4700 RU imobilizovaného HLA-A2-flu pri 25 °C a rýchlosti prietoku 5  $\mu$ l/min (Hodnoty sú upravené vzhľadom na podiel pozadia, ktorý bol meraný na 4100 RU imobilizovaného CD5); rýchlosť TCR nie je ovplyvnená simultánnym viazaním sa CD8.

Obrázok 32 znázorňuje proteínovú sekvenciu (jednopísmenový kód hore) a DNA sekvenciu (spodná) rozpustného TCR  $\alpha$  reťazca z JM22, ktorý je definovaný flu matricovým proteínom prezentovaným na HLA-A2, ako je fúzovaná s *c-jun* doménou "leucínového zipsu". Mutácie zavedené na 5' koniec DNA sekvencie na zosilnenie expzie génu v *E. coli* sú označené malými písmenami, ako aj sekvencia spojovníka medzi TCR a *c-jun* sekvenciami.

Obrázok 33 znázorňuje proteínovú sekvenciu (jednopísmenový kód hore) a DNA sekvenciu (spodná) rozpustného TCR  $\beta$  reťazca z JM22, ktorý je definovaný flu matricovým proteínom prezentovaným na HLA-A2, ako je fúzovaná s *c-fos* doménou "leucínového zipsu". Sekvencia spojovníka medzi TCR a *c-fos* sekvenciami je označená malými písmenami. Mutácia DNA sekvencie, ktorou je substituovaný cysteínový zvyšok za serínový zvyšok, je vytlačená hrubo a podčiarknutá. Táto mutácia zvyšuje účinok skladania TCR.

Obrázok 34 znázorňuje proteínovú sekvenciu (jednopísmenový kód hore) a DNA sekvenciu (spodná) rozpustného TCR  $\beta$  reťazca z JM22, ktorý je definovaný flu matricovým proteínom prezentovaným na HLA-A2, ako je fúzovaná s *c-fos* doménou "leucínového zipsu" a biotinylačným prívieskom, ktorý slúži ako substrát pre BirA. Sekvencia spojovníka medzi TCR a *c-fos* sekvenciami je označená malými písmenami. Mutácia DNA sekvencie, ktorou je substituovaný cysteínový zvyšok za serínový zvyšok, je vytlačená hrubo a podčiarknutá. Táto mutácia zvyšuje účinok skladania TCR.

Obrázok 35 je schematickým znázornením fúzovaného proteínu obsahujúceho TCR, zips a biotinylačný príviesok.

Obrázok 36. Eluovanie preskladaného TCR z POROS 10HQ kolóny s gradientom chloridu sodného. TCR sa eluuje ako jeden vrchol pri koncentrácii približne 100 mM NaCl. Frakcie obsahujúce proteín s hodnotou pri OD(280 nm) vyššou ako 0,1 sa spojili a zakoncentrovali na biotinyláciu.

Obrázok 37. Separácia biotinylovaného TCR od voľného biotínu prostredníctvom gélovej filtrácie na Superdex 200HR 10/30 kolóne (Pharmacia). TCR-biotín sa eluuje približne pri 15 ml a zodpovedá molekulovej hmotnosti 69 kDa. (Štandardné proteíny a ich elučné objemy: tyroglobulín (669 kDa) 10,14 ml, apoforitín (443 kDa) 11,36 ml,  $\beta$ -amyláza (200 kDa) 12,72 ml, BSA dimér (134 kDa) 13,12 ml, BSA monomér (67 kDa) 14,93 ml, ovoalbumín (43 kDa) 15,00 ml, chymotrypsinogén A (25 kDa) 18,09 ml, Rnáza A (13,7 kDa) 18,91 ml).

Obrázok 38 znázorňuje proteínovú sekvenciu (jednopísmenový kód hore) a DNA sekvenciu (spodná) rozpustného TCR  $\alpha$  reťazca z klonu A6, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax prezentovaným na HLA-A2 (Garboczi a ďalší, 1996; Garboczi a ďalší 1996), ako je fúzovaná s *c-jun* doménou "leucínového zipsu". Mutácie zavedené na 5' koniec DNA sekvencie na zosilnenie expresie génu v *E. coli* sú označené malými písmenami, ako aj sekvencia spojovníka medzi TCR a *c-jun* sekvenciami.

Obrázok 39 znázorňuje proteínovú sekvenciu (jednopísmenový kód hore) a DNA sekvenciu (spodná) rozpustného TCR  $\beta$  reťazca z klonu A6, ktorý je

definovaný HTLV-1 Tax prezentovaným na HLA-A2 (Garboczi a ďalší, 1996; Garboczi a ďalší 1996), ako je fúzovaná s *c-fos* doménou "leucínového zipsu" a biotinylačným prívieskom, ktorý slúži ako substrát pre BirA. Sekvencia spojovníka medzi TCR a *c-fos* sekvenciami je označená malými písmenami. Mutácia DNA sekvencie, ktorou je substituovaný cysteínový zvyšok za alanínový zvyšok, je vytlačená hrubo a podčiarknutá.

Obrázok 39 znázorňuje proteínovú sekvenciu (jednopísmenový kód hore) a DNA sekvenciu (spodná) rozpustného TCR  $\alpha$  reťazca z klonu M10B7/D3, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax prezentovaným na HLA-A2 (Ding a ďalší 1998), ako je fúzovaná s *c-jun* doménou "leucínového zipsu". Sekvencia spojovníka medzi TCR a *c-jun* sekvenciami je označená malými písmenami.

Obrázok 41 znázorňuje proteínovú sekvenciu (jednopísmenový kód hore) a DNA sekvenciu (spodná) rozpustného TCR  $\beta$  reťazca z klonu M10B7/D3, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax prezentovaným na HLA-A2 (Ding a ďalší 1998), ako je fúzovaná s *c-fos* doménou "leucínového zipsu" a biotinylačným prívieskom, ktorý slúži ako substrát pre BirA. Sekvencia spojovníka medzi TCR a *c-fos* sekvenciami je označená malými písmenami. Mutácia DNA sekvencie, ktorou je substituovaný cysteínový zvyšok za alanínový zvyšok, je vytlačená hrubo a podčiarknutá. Malými písmenami sú označené aj dve tiché mutácie (P-G kodóny) zavedené za účelom klonovania a na odstránenie *XmaI* restrikčného miesta.

### Príklady uskutočnenia vynálezu

Nižšie uvedené všeobecné metódy a materiály boli použité v nasledujúcich príkladoch.

#### Materiály

Restrikčné enzýmy (*NdeI*, *BamHI*, *HindIII*, *Bsu36I*, *XmaI*) boli od New England Biolabs.

Tris pH 8,1 bol pripravený ako 2M zásobný roztok z rovnakých podielov Tris-bázy a Tris-HCl, pričom oba boli od firmy USB.

EDTA (Sigma) sa pripravil ako 0,5M zásobný roztok a pH sa nastavilo na 8,0 použitím 5M NaOH (Sigma).

Glutatión v oxidovanej a redukovanej forme bol od firmy Sigma.

Cystamín a cysteamín bol od firmy Sigma.

Chlorid sodný bol od firmy USB a bol pripravený ako 4M zásobný roztok.

Miniprep kity na purifikáciu plazmidov boli od firmy Quiagen.

PCR purifikačné kity boli od firmy Quiagen.

DTT bol od firmy Sigma.

Guanidín bol od firmy Fluka.

Močovina bola od firmy Sigma.

RPML médium bolo od firmy Sigma.

PBS bol pripravený z tabliet od firmy Oxoid.

Glycerol bol od firmy BDH.

#### Všeobecné metódy

Bakteriálne médiá (TYP médiá) sa pripravili nasledovne:

160 g kvasinkového extraktu (Difco), 160 g tryptónu (Difco), 50 g NaCl (USB) a 25 g  $K_2HPO_4$  (BDH) sa rozpustilo v 2 l demineralizovanej vody. 200ml alikvoty tohto roztoku sa rozliali do desiatich 2l kužeľovitých fliaš a doplnili sa do 1 l pridaním 800 ml demineralizovanej vody. Fľaše sa zakryli štyrmi vrstvami hliníkovej fólie, označili sa a autoklávovali sa. Po ochladení a pred použitím sa fľaše uskladnili pri laboratórnej teplote mimo dosahu priameho slnka.

Koncentrácie proteínov sa merali použitím Pierce Coomassie-väzobného testu a použitím BSA ako štandardného proteínu. V stručnosti, 0 až 25  $\mu$ g BSA štandardov v 1 ml vody sa pripravilo zo zásobného BSA (Pierce) s koncentráciou 2 mg/ml v 4ml plastických kyvetách. Rovnakým spôsobom sa pripravilo približne 10  $\mu$ g neznámeho proteínu v 1ml s vodou. Do každej kyvety sa pridal 1 ml Pierce Coomassie reakčného činidla a obsahy sa dôkladne premiešali. Optická hustota sa

merala do 15 minút pri 595 nm použitím Beckman DU-530 UV spektrofotometra. Na základe výsledkov z BSA štandardov sa uskutočnila lineárna regresia (linearita bola dobrá až do 25  $\mu\text{g}$  BSA) a koncentrácia neznámeho proteínu sa odhadla interpoláciou z týchto výsledkov.

Gélová filtračná chromatografia sa uskutočňovala na vybavení Pharmacia FPLC systémom s počítačovým riadením. Eluovanie proteínu sa monitorovalo použitím UV-M II systému merania absorpcie pri vlnovej dĺžke 280 nm. Na separácie v malom merítke sa využila Superdex 200 HR 10/30 kolóna a vzorka sa nanášala v objeme 1 ml. Pred spustením sa kolóna ekvilibrovala s 30 ml PBS a vzorka bežala rýchlosťou 0,5 ml/min, pričom sa odoberali 1ml frakcie. Na separácie vo veľkom merítke sa použila Superdex 75 alebo 200 PG 26/60 kolóna s 10ml nanášaním. V tomto prípade sa odoberali 5 alebo 10ml vzorky a kolóna bežala s prietokom 4 ml/min. Všetky separácie sa uskutočňovali pri laboratórnej teplote.

Iónová výmenná chromatografia sa uskutočňovala na Biocad Sprint systéme (Perkin-Elmer). Na kationovú výmenu sa použila 20 HS alebo 50 HS kolóna. Na aniónovú výmenu sa použila 10 HQ, 20 HQ alebo 50 HQ kolóna. Kolóny bežali s použitím odporúčaných tlmivých roztokov, pričom boli pripojené na 6-smerný mixér. Malé vzorky (5 až 25 ml) sa injektovali použitím 5ml injekčného dávkovača. Väčšie vzorky (viac ako 100 ml) sa injektovali použitím jednej z tlmivých línií. Počas elučnej fázy priebehu kolóny sa odoberali 1ml frakcie. Eluovanie proteínu sa meralo prostredníctvom in-line absorpcie pri 280 nm.

SDS polyakrylamidová gélová elektroforéza (SDS-PAGE) sa uskutočňovala použitím Bio-Rad Mini-Protean II gélovej sady. Gély sa nalievali pred použitím nasledujúcim postupom. Pripravila sa zostava gélových platní a skontrolovala sa, aby bola zaistená proti presakovaniu. Potom sa pripravila nasledujúca zmes: 12% akrylamid/bisakrylamid (z 30% akrylamid/0,8% bisakrylamidového zásobného roztoku (National Diagnostics)), 0,375M Tris pH 8,8 (z 1,5M zásobného roztoku s rovnakým pH), 0,1% SDS (z 10% SDS zásobného roztoku), 0,05% persulfát amónny (z 10% zásobného roztoku uskladneného pri 4 °C) a 0,1% TEMED (Sigma). Zmes sa okamžite naliala do gélovej platňovej zostavy a na vrch sa nalial

vodou nasýtený butanol, aby sa zaistilo, že povrch bude rovný. Potom ako sa gél usadil (minimálne 10 až 15 minút) sa nasledovne namiešal hraničný gél. 4% akrylamid (z vyššie uvedeného zásobného roztoku), 0,125M Tris pH 6,8 (z 0,5M zásobného roztoku s rovnakým pH), 0,1% SDS, 0,05% persíran amónny a 0,2% TEMED. Z povrchu rozlišovacieho gélu sa odstránil butanol absorpciou na tkaninu a na vrch rozlišovacieho gélu sa naliala zmes hraničného gélu. Okamžite sa vsunul hrebeň, pričom sa dbalo na to, aby nevnikli vzduchové bubliny do gélu a hraničný gél sa nechal usadiť minimálne 5 minút.

Gél sa potom vložil do gélovej aparatury a v mieste anódy a katódy sa do aparatury vliat priebehový tlmivý roztok (3 g/l Tris-bázy, 14,4 g/l glycinu, 1 g/l SDS (naridený z 10x koncentrovaného zásobného roztoku). Po odstránení géloveho hrebeňa sa jamky vymyli priebehovým tlmivým roztokom, aby sa z dna jamiek odstránili zvyšky akrylamidovej zmesi. Vzorky sa pripravili zmiešaním proteínu v pomere 1:1 s nasledujúcou zmesou: 4% SDS, 0,125M Tris pH 6,8, 20% glycerol, 10%  $\beta$ -merkaptotanol, 1% brómfenolová modrá (Sigma). Vzorky sa potom zahriali na 95 °C 2 minúty a ochladili sa pred nanosením, pričom sa nanášalo do 25  $\mu$ l na jamku v hraničnom géli. Zvyčajne sa nanášalo približne 1 až 10  $\mu$ g proteínu, aby sa zaistilo dobré farbenie a priebeh gélu. Po nanosení sa vzorky nechali v géloch bežať pri konštantnom napätí 200 V približne 40 minút alebo pokiaľ nebola brómfenolová modrá farbička približne 5 mm od konca gélu.

Po ukončení elektroforézy sa gély vybrali z aparatury a opatrne sa ponorili do 0,1% roztoku Coomassie R-250 (Sigma) v 10 % kyseliny octovej, 40 % metanolu, 50 % vody. Gély sa potom jemne miešali najmenej 30 minút na odfarbenie v niekoľkých dávkach 10 % kyseliny octovej, 40 % metanolu, 50 % vody, pokiaľ nebolo gélové pozadie čisté. Gély sa potom uskladnili vo vode a zosnímali sa použitím UVP géloveho dokumentačného systému pozostávajúceho zo svetelného boxu, digitálneho fotoaparátu a termálnej tlačiarne.

#### Príklad 1

#### Rekombinantný rozpustný TCR

Rekombinantná rozpustná forma heterodimérnej TCR molekuly sa skonštruovala ako je znázornené na obrázku 1. Každý reťazec pozostáva z imunoglobulínovej domény bližšej a imunoglobulínovej doméry vzdialenejšej od membrány, ktoré sú fúzované prostredníctvom krátkeho flexibilného spojovníka s motívom stočeného závitú, ktorý pomáha stabilizovať heterodimér.

TCR konštantné domény sa skrátili tesne pred cysteínovými zvyškami, ktoré *in vivo* tvoria medzireťazcovú disulfidovú väzbu. Z toho vyplýva, že dva reťazce sa párujú prostredníctvom nekovalentných kvartérnych kontaktov, čo je potvrdené na obrázku 2b. Keďže Fos-Jun zipsové peptidové heterodiméry sú schopné vytvárať aj medzireťazcový disulfid hneď na N-konci vzhľadom k použitému spojovníku (O'Shea a ďalší 1989), predpokladalo sa, že vzájomné zoradenie dvoch reťazcov je optimálne. Fúzované proteíny musia byť spojené spôsobom, ktorý je kompatibilný s každou z oddelených zložiek, aby sa zabránilo porušeniu hociktorej štruktúry.

cDNA kódujúca  $\alpha$  a  $\beta$  reťazec TCR špecifického pre influenza-matricový proteínový 59-66 epitop v HLA-A2 sa získala z V $\beta$ 17 + ľudský CTL klonu (JM22) ukotvenou PCR, ako bolo predtým opísané (Moss a ďalší 1991).

Alfa a beta TCR-zipsové konštrukty, pJM22 $\alpha$ -Jun a pJM22 $\beta$ -Fos, sa oddelene skonštruovali amplifikáciou variabilnej a konštantnej domény každého reťazca použitím štandardnej PCR technológie a priradením produktov na leucínové zipsové domény z eukaryotických transkripčných faktorov Jun a Fos (pozri obrázok 1). Ukázalo sa, že tieto sekvencie dlhé 40 aminokyselín špecificky vytvárajú heterodimér, keď sa preskladajú zo syntetických peptidov, bez toho, aby bola potrebná kovalentná medzireťazcová väzba (O'Shea a ďalší 1989).

Primery boli navrhnuté tak, aby obsahovali vysoký obsah AT hneď na 3' konci za iniciačným kodónom (aby bola destabilizovaná sekundárna štruktúra mRNA), a s využitím *E. coli* kodónovej preferencie, aby sa maximalizovala expresia (Gao a ďalší). Prebytočný cysteín v TCR beta konštantnej doméne sa mutoval na serín, aby sa zaistila prevencia nesprávneho disulfidového viazania počas preskladávania.

DNA konštrukty sa ligovali oddelene do *E. coli* expresného vektora pGMT7. Fragmenty plazmidov vzniknuté štiepením a DNA sekvenovanie potvrdili, že konštrukty sú správne.

#### Podrobný opis použitých postupov

Expresia TCR zipsových reťazcov a purifikácia denaturovaných inklúzných teliesok: GFG020 a GFG021, pGMT7 expresné plazmidy obsahujúce JM22 $\alpha$ -Jun a JM22 $\beta$ -Fos sa transformovali oddelene do *E. coli* kmeňa BL21pLysS a jednotlivé ampicilín rezistentné kolónie sa pestovali pri 37 °C v TYP (ampicilín 100  $\mu$ g/ml) médiu do OD<sub>600</sub> hodnoty 0,4 pred tým, ako sa indukovala expresia proteínu s 0,5mM IPTG. Bunky sa zozbierali tri hodiny po indukcii centrifugáciou 30 minút pri 4000 otáčkach/min v Beckman J-6B. Bunkové pelety sa resuspendovali v tlmivom roztoku obsahujúcom 50mM Tris-HCl, 25% (w/v) sacharózu, 1mM NaEDTA, 0,1% (w/v) NaAzid, 10mM DTT, pH 8,0. Potom, ako sa resuspendované bunky cez noc zmrazili a rozmrazili, sonifikovali sa v minútových intervaloch celkovo približne 10 minút v Milsonix XL2020 sonifikátore použitím štandardnej sondy s priemerom 12 mm. Pelety z inklúzných teliesok sa znova izolovali centrifugáciou 30 minút pri 13000 ot./min v Beckman J2-21 centrifúge. Potom sa uskutočnilo trikrát premývanie s detergentom, aby sa odstránili zvyšky buniek a membránové komponenty. Zakaždým sa pelet inklúzných teliesok homogenizoval v Triton tlmivom roztoku (50mM Tris-HCl, 0,5% Triton-X100, 200mM NaCl, 10mM NaEDTA, 0,1% (w/v) NaAzid, 2mM DTT, pH 8,0) pred tým ako sa peletoval centrifugáciou 15 minút pri 13000 otáčkach/min v Beckman J2-21. Detergent a soľ sa potom odstránili podobným premývaním v nasledujúcom tlmivom roztoku: 50mM Tris-HCl, 1mM NaEDTA, 0,1% (w/v) NaAzid, 2mM DTT, pH 8,0. Nakoniec sa pelety JM22 $\alpha$ -Jun a JM22 $\beta$ -Fos inklúzných teliesok rozpúšťali oddelene v močovinovom roztoku (50mM MES, 8M močovina, 10mM NaEDTA, 2mM DTT, pH 6,5) 3 až 4 hodiny pri 4 °C. Nerozpustný materiál sa peletizoval centrifugáciou 30 minút pri 13000 otáčkach/min v Beckman J2-21 a supernatant sa rozdelil na 1ml alikvoty a zmrazil sa pri -70 °C. Inklúzne teliska solubilizované v močovine sa kvantifikovali Bradfordovým testom

viazania farbičky (Biorad). Z jedného litra kultúry sa získal výťažok približne 100 mg purifikovaných inklúzných teliesok pre každý reťazec. Každé inklúzne teliesko (JM22 $\alpha$ -Jun, JM22 $\beta$ -Fos) sa solubilizovalo v močovinovom roztoku v koncentrácii približne 20 mg/ml a gélovou analýzou sa odhadlo, že v tejto forme majú približne 90% čistotu (údaje nie sú znázornené).

#### Spoločné preskladávanie TCR-zipsových fúzovaných proteínov

Výsledkom počiatkových preskladávacích experimentov s použitím štandardného preskladávacieho tlmivého roztoku (100mM Tris pH 8,5, 1M L-arginín, 2mM EDTA, 5mM redukovaný glutatión, 0,5mM oxidovaný glutatión, 0,2mM PMSF) bola ťažká proteínová precipitácia, ktorá bola závislá na prítomnosti zipsových domén. Z faktu, že tento fenomén sa vyskytoval pri koncentráciách, ktoré boli nižšie ako disociačná konštanta zipsovej dimerizácie (tzn. hodnota, pre ktorú sa očakáva, že väčšina zipsových závitníc je monoména), vyplýva, že nesprávne poskladané druhy stabilizovali ďalšie sily. Najpravdepodobnejším vysvetlením je, že najprv sa poskladajú celé alfa-závitnicové zipsové domény a ich prechodná heterodimerizácia indukuje medzireťazcovú agregáciu čiastočne poskladaných medziproduktov komplexnejších imunoglobulínových domén. Preto sa preskladávací tlmivý roztok zmenil tak, že obsahoval 5M močovinu, aby sa zabránilo hydrofóbnym interakciám medzi čiastočne poskladanými imunoglobulínovými doménami, aby sa jednotlivé reťazce mohli úplne poskladať pred heterodimerizáciou. Tento krok je dostatočný na to, aby sa zabránilo precipitácii, a aby sa mohli správne poskladané TCR-zipsové heterodiméry zostaviť s prijateľným výťažkom použitím nasledujúceho protokolu.

Zásobné roztoky TCR-zipsových reťazcov JM22 $\alpha$ -Jun a JM22 $\beta$ -Fos solubilizované v močovine sa renaturovali riediacim spoločným preskladaním. Zo zmrazených zásobných roztokov sa roztopilo približne 30 mg (tzn. 1  $\mu$ M) každého reťazca solubilizovaného inklúzneho telieska a pridal sa ďalší pulz DTT (4  $\mu$ M/ml), aby sa zabezpečila úplná redukcia cysteínových zvyškov. Vzorky sa potom zmiešali a zmes sa nariesila v 15 ml guanidínového roztoku (6M guanidín-hydrochlorid,

10mM octan sodný, 10mM EDTA), aby sa zaistila úplná denaturácia reťazca. Guanidínový roztok obsahujúci úplne redukované a denaturované TCR-zipsové reťazce sa potom injektoval do 1 litra nasledujúceho preskladávacieho tlmivého roztoku: 100mM Tris pH 8,5, 400mM L-arginín, 2mM EDTA, 5mM redukovaný glutatión, 0,5mM oxidovaný glutatión, 5M močovina, 0,2mM PMSF. Rostok sa nechal stáť 24 hodín. Preskladovaný produkt sa potom dva krát dialyzoval, najprv oproti 10 litrom 100mM močoviny, a druhý krát oproti 10 litrom 10mM močoviny, 10mM Tris pH 8,0. Tak preskladávací, ako aj dialyzačný krok sa uskutočňovali pri 6 až 8 °C.

#### Purifikácia preskladaného TCR-zipsu

TCR-zipsový JM22zip sa oddelil od degradačných produktov a nečistôt nanosením dialyzovaného preskladaného produktu na POROS 10HQ analytickú aniónovú výmennú kolónu v siedmych 200ml alikvotách a eluovaním naviazaného proteínu s gradientom 0 až 400mM NaCl na 50 objemov kolóny použitím BioCad pracovnej stanice (Perseptive Biosystems). Nekovalentne spojený heterodimér eluoval v jednom vrchole pri približne 100mM NaCl. Vrcholové frakcie (typicky obsahujúce heterodimér v koncentrácii 100 až 300 µg/ml) sa uskladňovali pred tým ako sa spojili a zakoncentrovali pri 4 °C. Výťažok heterodiméru je približne 15 %.

#### Charakterizácia preskladaného TCR-zipsového JM22zip

JM22zip heterodimér purifikovaný aniónovou výmenou sa eluoval ako približne 70kDa proteín zo Superdex 200 gélovej filtračnej veľkostnej kolóny (Pharmacia). Je veľmi dôležité zahrnúť gélové filtračné kroky pred povrchovou plazmónovou rezonančnou väzobnou analýzou, pretože presné merania afinity a kinetiky sú závislé na prítomných monomérych interakciách. Týmto spôsobom je možné z frakcie rozpustného proteínu použiť na analýzu vylúčiť agregáty vyššieho rádu. Najmä je možné detegovať agregáty zapríčiňujúce pomalé asociačné a disociačné rýchlostné konštanty.

Oxidačný stav každého reťazca bol skúmaný redukčnou/neredukčnou gélovou analýzou znázornenou na obrázku 2. V prítomnosti SDS sa nekovalentne asociovaný heterodimér disociuje na  $\alpha$  a  $\beta$  reťazce. Ak sa v nanášacom tlmivom roztoku použije DTT, oba reťazce idú po oboch stranách 31kDa markera. Ak takéto denaturanty chýbajú, oba reťazce sa správajú ako oddelené druhy, ale mobilita každého sa zvyšuje, z čoho vyplýva, že každý reťazec tvorí jeden, disulfidovou väzbou viazaný, druh (Garboczi a ďalší 1996).

Protilátková reaktivita preskladaného receptora sa testovala použitím povrchovej plazmónovej rezonancie na Biacore 2000 prístroji (Biacore). TCR-žipsový JM22z sa imobilizoval na dextránovom matricovom (CM číp) väzobnom povrchu pri pH 5,5 použitím štandardných amínových párovacích metód. Variabilná oblasť protilátky špecifickejšej pre beta reťazec (V $\beta$ 17) sa špecificky viazala na imobilizovaný receptor, z čoho vyplývala správna konformácia.

## Stabilita

Rozpusťné TCRs exprimované ako alfa-jun a beta-fos leucínové žipsové fúzie sú stabilné mesiace, a sú preto vhodné na detekciu špecifických antigénov prezentovaných MHC triedy I.

## Príklad 2

### Kinetiky a afinitná štúdia ľudského TCR-vírusový peptid-MHC

#### Špecifické viazanie sa preskladaného TCR-žipsu na peptid-MHC komplexy

Povrchový plazmónový rezonančný biosenzor (Biacore) sa použil na analýzu viazania sa TCR-žipsu (JM22zip, špecifický pre HLA-A2 influenza matricový proteínový M58-66 komplex) na jeho peptid-MHC ligand (pozri obrázok 3). Uľahčili sme to vyprodukovaním jednotlivých pMHC komplexov (opísané nižšie), ktoré môžu byť imobilizované na streptavidín pokrytom väzobnom povrchu semi-orientovaným spôsobom, čo umožňuje účinné testovanie viazania sa rozpusťného T-bunkového receptora až na štyri odlišné pMHC (imobilizované na oddelených tečúcich

bunkách) simultánne. Manuálne injektovanie HLA komplexu umožňuje jednoduchú manipuláciu s presnou hladinou imobilizovaných molekúl triedy I.

Takto imobilizované komplexy sú schopné viazať tak T-bunkové receptory (pozri obrázok 3), ako aj koreceptor  $CD8\alpha\alpha$ , ktoré oba môžu byť injektované v rozpustnej fáze. Špecifické viazanie sa TCR-zipsu sa získa aj pri nízkych koncentráciách (najmenej 40  $\mu\text{g/ml}$ ), z čoho vyplýva, že TCR zips je relatívne stabilný. Pozorovalo sa, že pMHC väzobné vlastnosti JM22z sú kvalitatívne a kvantitatívne podobné, keď sa použije TCR tak v rozpustnej forme, ako aj v imobilizovanej fáze. To je dôležitá kontrola čiastočnej aktivity rozpustných druhov, a tiež z toho vyplýva, že biotinylované pMHC komplexy sú rovnako biologicky aktívne ako nebiotinylované komplexy.

#### Príprava chemicky biotinylovaných HLA komplexov

Spôsoby produkcie rozpustných, rekombinantných komplexov tvorených HLA triedy I a jedným peptidom už boli opísané (Garboczi a ďalší 1992). Tieto spôsoby boli modifikované tak, aby produkovali HLA komplexy, ktoré majú  $\beta$ -2-mikroglobulínové domény chemicky biotinylované, a tak môžu byť imobilizované na streptavidínom pokrytom čipe a použité na povrchové plazmónové väzobné štúdie.

Exprimoval sa  $\beta$ -2-mikroglobulín a 40 mg sa preskladalo v štandardnom preskladávacom tlmivom roztoku (100mM Tris pH 8,5, 400mM L-arginín, 2mM EDTA, 5mM redukovaný glutatión, 0,5mM oxidovaný glutatión, 0,1mM PMSF) v podstate ako bolo opísané (Garboczi a ďalší 1992). Po voliteľnom gélovom filtračnom kroku sa proteín vymenil s 0,1M borátom sodným pH 8,8 a nakoniec sa zakoncentroval na 5 až 10 mg/ml.  $\beta$ -2-mikroglobulín sa kvantifikoval aj použitím Bradfordovho testu (Biorad). 5 molárny nadbytok biotín hydroxysukcínimidu (Sigma) sa pridal zo zásobného roztoku pripraveného v koncentrácii 10 mg/ml v DMSO. Reakčná zmes sa nechala 1 hodinu pri laboratórnej teplote a zastavila sa použitím zmesi 20  $\mu\text{l}$  1M chloridu amónneho a 250  $\mu\text{g}$  biotínového esteru. Preskladávaný HLA komplex sa oddelil od voľného biotínu a voľného biotinylovaného  $\beta$ -2-mikro-

globulínu použitím Superdex 200 gélovej filtračnej veľkostnej kolóny (Pharmacia). Streptavidín sa imobilizoval štandardnými amínovými párovacími metódami.

## Záver

Takže spôsoby preskladávania proteínu opísané v príklade 1 produkujú stabilný, správne poskladaný, funkčný, rekombinantný receptorový fúzovaný proteín, ktorý je schopný byť biofyzikálne analyzovaný použitím optického biosenzora. Tak sa poskytlo reakčné činidlo používané na uskutočňovanie detailných afinitných a kinetických analýz interakcie ľudského TCR a pMHC. Boli študované vzájomné účinky interakcií T-bunkového koreceptora a MHC a interakcií TCR a pMHC. Použité rekombinantné techniky sú v princípe aplikovateľné tak na hlodavčie, ako aj ľudské TCRs, definované tak triedou I, ako aj triedou II, a budú umožňovať podobné analýzy určitého rozsahu TCRs. To by umožnilo pokladanie rôznych otázok, akými sú napríklad rozsah TCR afínit v rámci protivírusovej odpovede, vlastnosti dominantne selektovaných receptorov a kinetické požiadavky na spúšťanie dejov prostredníctvom receptora. Metódy poskytujú aj spôsob overovania ligandovej špecificity TCR pred kryštalizačnými testami, a môžu mať aj vplyv na rekombinantnú produkciu iných bunkových povrchových receptorov.

## Príklad 3

### Biotinylácia a tetramerizácia rozpustných T-bunkových receptorov

2,5 ml purifikovaného rozpustného TCR pripraveného ako bolo opísané v príklade 1 (približne 0,2 mg/ml) sa v tlmivom roztoku vymenilo do biotinylačného reakčného tlmivého roztoku (10mM Tris pH 8,0, 5mM NaCl, 7,5 mM MgCl<sub>2</sub>) použitím PD-10 kolóny (Pharmacia). Eluát (3,5 ml) sa zakoncentroval na 1 ml použitím centricon koncentrátora (Amicon) prepúšťajúcim maximálne 10kDa molekuly. To sa urobilo do 5mM, pričom sa zo zásobného roztoku (0,1 g/ml nastavený na pH 7,0) pridalo ATP. Pridal sa koktejl proteázových inhibítorov, leupeptín, pepstatín a PMSF (0,1 mM), nasledoval 1mM biotín (pridaný z 0,2M zásobného roztoku) a 5 µg/ml enzýmu (z 0,5 mg/ml zásobného roztoku). Zmes sa potom inkubovala cez noc pri laboratórnej teplote. Nadbytok biotínu sa z roztoku

odstránil dialýzou oproti 10mM Tris pH 8,0, 5mM NaCl (200 objemov, s 2 výmenami pri 4 °C). Proteín sa potom testoval z hľadiska prítomnosti naviazaného biotínu prostredníctvom blotingu na nitrocelulózu, po ktorom nasledovalo blokovanie s 5% odstredeným mliečnym práškom a detekcia použitím streptavidín-HRP konjugátu (Biorad). Tetramerizácia biotinylovaného rozpustného TCR sa uskutočňovala buď extravidín-RPE konjugátom alebo extravidín-FITC konjugátom (Sigma). Koncentrácia biotín-rozpustného TCR sa merala použitím Coomassie väzobného proteínového testu (Pierce) a vypočítal sa pomer extravidínového konjugátu a rozpustného TCR s hodnotou 0,224 mg/1 mg, aby sa dosiahlo nasýtenie extravidínu biotinylovaným TCR v pomere 1:4. Pridával sa extravidínový konjugát v alikvotách 1/10 celkového pridaného množstva na ľade najmenej 15 minút na alikvotu (aby sa zaistila saturácia extravidínu). Rozpustné TCR tetraméry sa uskladňovali pri 4 °C v tme. Mesiace boli tetraméry extrémne stabilné.

#### Príklad 4

Molekulárne klonovanie génov T bunkového receptora z T bunkových línií alebo T bunkových klonov so známou špecifitou

Spôsoby a postupy molekulárneho klonovania TCR génov z buniek sú rovnaké pre všetky  $\alpha$  reťazce a pre všetky  $\beta$  reťazce, a preto budú opísané len v tomto príklade.

Vhodné množstvo T buniek, typicky 1 až 5 miliónov, sa lyzovalo v lyzačnom tlmivom roztoku z "mRNA Capture Kit" (Boehringer Mannheim). S reakčnými činidlami kitu sa izolovala mRNA hybridizáciou biotinylovaného oligo-dT na poly-A chvosty mRNA. Potom sa zachytili hybridizované komplexy prostredníctvom viazania sa biotínu na PCR skúmavku pokrytú streptavidínom. Po imobilizácii mRNA v PCR skúmavke sa generovala cDNA použitím AMV reverznej transkriptázy (Stratagene) ako je opísané (Boehringer Mannheim manuál pre "mRNA Capture Kit").

Na takto imobilizovanej cDNA sa generovali poly-G chvosty na 3' koncoch použitím enzýmu terminálna transferáza (Boehringer Mannheim). Potom sa pridala PCR reakčná zmes vrátane termostabilnej polymerázy *pfu* s vysokou presnosťou (klonovaná, Stratagene), ktorá bola použitá, aby sa minimalizovalo riziko chýb v PCR produktoch. Uskutočnili sa PCR reakcie použitím poly-C "ukotvovacieho primera" (obrázok 4A) a primerov špecifických pre  $\alpha$  a  $\beta$  reťazec (obrázok 4B, respektíve 4C), ktoré anelujú na zodpovedajúce TCR konštantné oblasti. Na amplifikáciu TCR génových fragmentov sa uskutočnili PCR reakcie v 30 cykloch denaturácie pri 95 °C počas 1 minúty, anelovania pri 50 °C počas 1 minúty a predlžovania pri 72 °C počas 5 minút.

PCR produkty sa ligovali do Bluescript sekvenačného vektora (pBluescript II KS-, Stratagene) použitím miest pre restriktčné enzýmy *XhoI* a *XmaI*, ktoré sa nachádzali v primeroch (všetky enzýmy od New England Biolabs). Po transfekcii ligačných zmesí do *E. coli* kmeňa XL-1Blue, sa niekoľko klonov vybralo na DNA sekvenovanie, ktoré sa uskutočňovalo na ABI 377 Prism automatickom sekvenátore použitím BigDye™ terminátorov (Applied Biosystems Inc.).

#### Príklad 5

Molekulárne klonovanie DNA fragmentov kódujúcich 40 aminokyselinové oblasti stočených závitov ("leucínové zipsy") *c-jun* a *c-fos*

DNA fragmenty kódujúce 40 aminokyselinové oblasti stočených závitov ("leucínové zipsy") *c-jun* a *c-fos* sa generovali PCR reakciami použitím ľudskej cDNA ako templátu a použitím primerov znázornených na obrázku 5. PCR reakcie sa uskutočňovali v reakčnom tlmivom roztoku obsahujúcom klonovanú *pfu* polymerázu (Stratagene) v 30 cykloch pozostávajúcich z denaturácie pri 95 °C počas 1 minúty, anelovania primeru pri 58 °C počas 1 minúty a predlžovania pri 72 °C počas 2 minút.

*C-jun* a *c-fos* fragmenty sa ligovali do pBluescript II KS- (Stratagene) použitím unikátnych *XhoI* a *SmaI* restriktčných miest, čím sa získali konštrukty

pBJ107, respektíve pBJ108 (obrázok 6). DNA sekvencie *c-jun* a *c-fos* fragmentov sa overili DNA sekvenovaním, ktoré sa uskutočňovalo na ABI 377 Prism automatickom sekvenátore použitím BigDye™ terminátorov (Applied Biosystems Inc.).

Sekvenované *c-jun* a *c-fos* fragmenty sa potom subklonovali použitím unikátnych *XmaI* a *BamHI* restriktčných miest do polyspojovnikovej oblasti T7 polymerázového expresného vektora pGMT7 (Studier, Rosenberg a ďalší 1990).

#### Príklad 6

Navrhnutie TCR-leucínových zipsových fúzovaných proteínov na produkciu stabilných, rozpustných TCRs

Pokusy spoločne preskladať extracelulárne fragmenty TCR  $\alpha$  a  $\beta$  reťazcov, ktoré boli skrátene tak, že obsahovali cysteínový zvyšok, ktorý *in vivo* vytvára disulfidovú väzbu, boli čiastočne úspešné (údaje nie sú uvedené, metódy exprese a všeobecné metódy a materiály a podmienky preskladávania pozri v príklade 9). Avšak, keď sa TCR  $\alpha$  a  $\beta$  reťazce skrátili tesne pred, teda na N-koncovej strane cysteínového zvyšku tvoriaceho medzireťazcovú disulfidovú väzbu, z analytickej chromatografie na Superdex G-75 kolóne (Pharmacia) vyplynulo, že malá časť proteínu, približne 1 až 2 % množstva použitého v preskladávacej reakcii, sa poskladala do komplexu s molekulovou veľkosťou očakávanou pre skrátene  $\alpha/\beta$  heterodimér (pozri aj Garboczi, Utz a ďalší 1996 ako odvolanie sa na metódu).

Keďže nesprávne vytvorenie disulfidovej väzby môže spôsobiť nevratné nesprávne poskladanie proteínu počas *in vitro* preskladávania, predpokladalo sa, že pravdepodobnosť takejto udalosti sa minimalizuje mutovaním cysteínového zvyšku v TCR  $\beta$  konštantnej oblasti, ktorá je v bunkovom TCR nespárovaná. Cysteínový zvyšok sa substituoval z serínový alebo za alanínový zvyšok. Na obrázku 7 sú znázornené syntetické DNA primery použité v týchto mutačných krokoch. Spoločné preskladávanie TCR  $\alpha$  a mutovaného  $\beta$  reťazca, ktoré oba boli skrátene tesne pred cysteínovým zvyškom, ktorý tvorí medzireťazcovú disulfidovú

väzbu, vykázalo dramatické zlepšenie výťažkov heterodiméru, pričom proteínová frakcia so správnou molekulovou hmotnosťou typicky tvorila 15 až 30 % celkového proteínu. Avšak, keď sa tieto rozpustné TCRs uskladnili cez noc, analýzy proteínu ukázali, že frakcia s molekulovou hmotnosťou zodpovedajúcou heterodimérnemu TCR sa rozdelila do dvoch vrcholov s molekulovou hmotnosťou zodpovedajúcou monomérom TCR  $\alpha$  a  $\beta$  reťazcom. Podobné pozorovania sa zistili pri riedení rozpustných TCRs, z čoho vyplýva, že stabilita  $\alpha/\beta$  reťazca bola nízka a nedostatočná na analýzy, ktoré by vyžadovali dlhší čas ako obmedzený počet hodín alebo riedenie proteínu. Z toho vyplýva, že tieto metódy na produkciu rozpustného TCR generovali len receptor s extrémne obmedzenou stabilitou.

Na zlepšenie TCR  $\alpha/\beta$  reťazcovej stability a potenciálne na napomáhanie formovaniu heterodiméru počas preskladávania sa TCR reťazce fúzovali s doménami "leucínového zipsu" *c-jun* a *c-fos*, o ktorých je známe, že prednostne vytvárajú heterodiméry (O'Shea, Rutkowski a ďalší 1989; Schuermann, Hunter a ďalší 1991; O'Shea, Rutkowski a ďalší 1992; Glover a Harrison 1995). Testovali sa dva návrhy fúzovaných TCRs.

V jednom sa leucínové zipsy fúzovali tesne za, to je na C-koniec, cysteínových zvyškov vytvárajúcich medzireťazcovú disulfidovú väzbu medzi TCR  $\alpha$  a  $\beta$  reťazcom. Keďže *c-jun* a *c-fos* leucínové zipsové peptidy sú schopné vytvárať medzireťazcový disulfid aj tesne na N-konci použitého spojovníka (O'Shea, Rutkowski a ďalší 1989), predpokladalo sa, že vzájomná zostava dvoch reťazcov a medzireťazcovej disulfidovej väzby bude optimálna.

V druhom návrhu sa leucínové zipsy fúzovali tesne pred, to je na N-koniec cysteínových zvyškov tvoriacich medzireťazcovú disulfidovú väzbu medzi TCR  $\alpha$  a  $\beta$  reťazcami (obrázok 8). Takže pri druhom návrhu sa v rekombinantnom receptore cysteínové zvyšky vynechali.

V preskladávacích experimentoch s TCR-zipsovými (TCR-z) reťazcami s týmito dizajnami sa zistilo, že výťažok heterodimérneho, rozpustného receptora bol lepší, keď sa cysteínové zvyšky vytvárajúce medzireťazcovú disulfidovú väzbu vynechali v TCR  $\alpha$  a  $\beta$  reťazcoch, ako je v návrhu znázornenom na obrázku 8.

## Príklad 7

### Konštrukcia DNA expresných vektorov pre TCR-leucínové zipsové proteíny

Tento príklad opisuje konštrukciu expresných vektorov pre  $\alpha$  a  $\beta$  reťazce piatich TCRs. Opísaná stratégia a dizajn by mali byť adaptovateľné na akékoľvek ľudské alebo živočíšne TCR gény. Hoci všetkých päť tu opísaných TCRs je definovaných epitopmi MHC triedy I, rovnako by tieto metódy mohli byť použité na klonovanie a konštrukciu expresných vektorov pre TCRs definované MHC triedy II. Všetky vektory exprimujú proteín, ktorý má byť súčasťou preskladaných rozpustných TCRs podľa návrhu znázorneného na obrázku 9, s tou výnimkou, že dva TCRs sú exprimované s biotinylovateľnou priveskovou sekvenciou na C-konci (pozri nižšie a obrázky 17, 18 a 19). Klonovacia stratégia je rovnaká pre všetky TCR  $\alpha$  a  $\beta$  reťazce.

Rozsah vedúcich alebo signálnych peptidových sekvencií TCR  $\alpha$  a  $\beta$  reťazcov sa predpokladal z analýz sekvenčných údajov získaných z plazmidov obsahujúcich TCR ukotvovacie PCR produkty (pozri príklad 4). Na tomto základe sa navrhli 5' primery na generovanie PCR fragmentov na expresiu TCR reťazcov bez vedúcich sekvencií (obrázok 9). Všetky 5' primery kódujú metionínový zvyšok tesne pred zrelými TCR proteínovými sekvenciami, aby bola možná translácia v *E. coli*. Tiché mutácie substituujúce C alebo G bázy za A alebo T (obrázok 9) sa zaviedli v množstve 5' proximálnych kodónov génov, aby sa znížila tendencia vytvárania sekundárnej mRNA štruktúry, ktorá by mohla inhibovať hladiny expresie v *E. coli* (PCR/GB98/03235; Gao, Tornmo a ďalší 1997; Gao, Gerth a ďalší 1998).

Gény kódujúce  $V\alpha 0.2$  a  $V\beta 17$  reťazce ľudského JM22 TCR, ktorý je definovaný Influenza matricovým peptidom prezentovaným na HLA-A0201 (peptidová sekvencia GILGFVFTL),  $V\alpha 23$  a  $V\beta 5.1$  reťazce ľudského TCR, ktorý je definovaný 003 HIV-1 Gag peptidom prezentovaným na HLA-A0201 (peptidová sekvencia SLYNTVATL), a  $V\alpha 4$  a  $V\beta 11$  hlodavčie reťazce F5 TCR, ktorý je definovaný NP peptidom prezentovaným na H2-D<sup>b</sup> (peptidová sekvencia ASNENMDAM), sa amplifikovali prostredníctvom PCR použitím plazmidov

obsahujúcich TCR ukotvovacie PCR produkty generované ako bolo opísané v príklade 6. Gény pre ľudské A6 ( $V\alpha 2.3/V\beta 12.3$ ) a B7 ( $V\alpha 17.2/V\beta 12.3$ ) TCRs, ktoré sú špecifické pre HTLV-1 Tax peptid prezentovaný prostredníctvom HLA-A0201 (peptidová sekvencia LLFGYPVYV) sa získali vo forme plazmidov (Garboczi, Utz a ďalší 1996; Ding, Smith a ďalší 1998), ktoré boli použité na generovanie PCR produktov na konštrukciu expresných vektorov pre tieto TCR reťazce. Gény pre tieto TCRs sa klonovali do expresných vektorov, ktoré obsahovali sekvenciu fragmentu fúzovaného z *c-fos* leucínového zipsu a biotinylovateľného privesku (pozri príklad 8).

PCR reakcie sa uskutočňovali s klonovanou *pfu* polymerázou v štandardných podmienkach v tlmivom roztoku (Stratagene) a s 25 cyklami denaturácie pri 95 °C počas 1 minúty, anelovania primeru pri 60 °C počas 1 minúty a predlžovania pri 72 °C počas 6 minút. PCR produkty sa poštiepili restriktčnými enzýmami *NdeI* a *XmaI* a ligovali sa do pGMT7 vektorov obsahujúcich *c-jun* (TCR  $\alpha$  reťazce) a *c-fos* (TCR  $\beta$  reťazce) inzerty (pozri príklad 5).

Obrázky 10 až 19 znázorňujú sekvencie TCR-z inzertov a predpokladané proteínové sekvencie exprimované pGMT7 vektormi. Obrázok 20 znázorňuje sekvenciu A6 TCR  $\beta$  reťazca obsahujúcu mutáciu v konštantnej oblasti, ktorá však detegovateľne neovplyvňovala skladanie a funkciu rozpustného TCR (pozri príklady 9 a 10).

#### Príklad 8

Konštrukcia DNA vektorov na expresiu TCR  $\beta$  reťazcov fúzovaných s *c-fos* leucínovým zipsovým-biotinylovateľným fragmentom

Na umožnenie imobilizácie rozpustných TCRs alebo na umožnenie detekcie, alebo na pripojenie na receptor, bolo by užitočné, keby mohol byť proteín produkovaný s ďalším funkčným fúzovaným komponentom. Tak by mohli byť vytvárané deriváty rozpustného TCR, ako napríklad multiméry, alebo by sa tak

mohla umožniť detekcia s vysokou citlivosťou alebo by sa mohli pripojiť iné funkcie receptor/receptor komplexom.

Tento príklad demonštruje konštrukciu expresných vektorov pre TCR  $\beta$  reťazce, v ktorých je zavedený fúzovaný polypeptid, ktorý môže byť špecificky biotinylovaný v *E. coli in vivo* alebo s enzýmom BirA *in vitro* (Barker a Campbell 1981; Barker a Campbell 1981; Howard, Shaw a ďalší 1985; Schatz 1993; O'Callaghan, Byford a ďalší 1999). Ako je ukázané v príkladoch 10 a 11, tieto rozpustné TCR fúzie sa môžu exprimovať a preskladať spolu s  $\alpha$  reťazcom rovnakým spôsobom, a s podobnými výťažkami, ako TCR  $\beta$  reťazec, ktorý nie je fúzovaný s "biotinylačným príveskom" (BT-prívesok). Tieto výsledky demonštrujú, že tu opísaný rozpustný TCR je pravdepodobne vhodný na expresiu s množstvom rôznych polypeptidov ako fúzovacích partnerov.

T bunkové receptorové  $\beta$  reťazce sa subklonovali so pGMT7 expresného vektora so sekvenciou biotínového prívesku na C-konci sekvencie *fos*-leucínového zipsu nasledovne:

štart-TCR  $\beta$  reťazec - *fos* zips - biotínový prívesok - stop

Presná sekvencia koncov konštruktov je nasledovná (pozri aj obrázok 21):

spojovník →| *fos* zips →| *BamHI* |← spojovník →|← biotínový prívesok

Na produkciu rozpustných TCRs s biotínovým príveskom boli použité dva prístupy. V prípade ľudského JM22 TCR, ktorý je definovaný Influenza matricovým peptidom prezentovaným na HLA-A0201, sa klonovaná fúzia, tvorená  $\beta$  reťazcom a *c-fos* leucínovým zipsom, modifikovala na 3' konci použitím syntetického DNA primeru znázorneného na obrázku 22 tak, aby sa zaviedlo *BamHI* miesto namiesto *HindIII* miesta, použitím štandardnej PCR reakcie s *pfu* polymerázou (Stratagene).

Pôvodný 5' primer (pozri obrázok 9) obsahujúci *NdeI* miesto bol použitý ako priamy primer. Vyrobený PCR produkt sa klonoval do modifikovaného pGMT7 vektora obsahujúceho sekvenciu s biotínovým príveskom (obrázok 21), aby sa vytvoril vyššie opísaný konštrukt. Tento plazmid je známy ako JMB002.

Klonovaný TCR špecifický pre HLA-A0201 definovaný HTLV-1 epitopovou sekvenciou LLFGYPVYV, známy ako A6 tax TCR ( $V\alpha 2.3/V\beta 12.3$ ), bol skrátenej použitím PCR s priamym a reverzným primerom, ktoré sú znázornené na obrázku 9. Tento TCR  $\beta$  reťazec bol klonovaný do *NdeI* a *XmaI* miest pGMT7 vektora (JMB002), ktorý obsahuje *c-fos*-BT fragment.

Po skonštruovaní fúzovaných expresných vektorov sa uskutočnilo DNA sekvenovanie, aby sa zaistilo, že počas subklonovacej procedúry nebola zavedená žiadna chyba (všetky sekvenovania sa uskutočňovali v Biochemistry Dept. DNA Sequencing Facility, Oxford University použitím ABI 377 Prism sekvenátora a ABI BigDye fluorescenčných terminátorov). Objavili sa dve chyby v tax TCR  $\beta$  reťazci v porovnaní s publikovanou sekvenciou a ďalším skúmaním sa zistilo, že tieto chyby boli obe prítomné už v pôvodnom plazmide, ktorý sme obdržali. Keďže obe tieto chyby boli na 3' konci unikátneho *Bsu36I* miesta v TCR  $\beta$  reťazci, toto miesto bolo použité na klonovanie do (správneho) JMB002 plazmidu. Obe verzie tax TCR  $\beta$  reťazca sa exprimovali a poskladali sa s  $\alpha$  reťazcom a porovnali sa použitím Biacore. Obe verzie proteínu sa špecificky viazali na molekuly tax peptid-MHC triedy I s podobnými relatívnymi afinitami (pozri príklad 17). V nasledujúcich experimentoch sa používala len správna verzia  $\beta$  reťazca.

## Príklad 9

### Expresia TCR reťazcov v *E. coli* a purifikácia inklúzných teliesok

TCR  $\alpha$  a  $\beta$  reťazce sa exprimovali oddelene v *E. coli* kmeni BL21DE3pLysS pod kontrolu vektora pGMT7 v TYP médiu použitím 0,5mM IPTG na indukciu produkcie proteínu, keď optická hustota (OD) pri 600nm dosiahla hodnotu medzi 0,2 a 0,6. Indukcia prebiehala cez noc a baktérie sa zozbierali centrifugáciou pri 4000 otáčkach/min v Beckman J-6B centrifúge.

Bakteriálne bunkové pelety sa potom resuspendovali v "lyzačnom tlmivom roztoku" (10mM Tris pH 8,1, 10mM EDTA, 150mM NaCl, 2mM DTT, 10% glycerol). Zmes sa ochladila na ľade a pridali sa nasledujúce látky: 20  $\mu$ g/ml lyzozýmu, 10mM

MgCl<sub>2</sub> a 20 µg/ml DNázy I, nasledovalo inkubovanie na ľade minimálne jednu hodinu.

Zmes sa potom sonifikovala použitím 12mM sondového sonikátora (Misonix XL2020) pri plnom výkone v 5 cykloch po 30 sekúnd s 30 sekundovými prestávkami, v ktorých sa umožnilo, aby sa zmes ochladila. Počas tejto procedúry sa udržiavala teplota použitím zmesi ľadu a vody. Zmes sa potom nariedila s 5 objemami "Triton premývacieho tlmivého roztoku" (50mM Tris pH 8,1, 0,5% Triton X-100, 100mM NaCl, 0,1% azid sodný, 10mM EDTA, 2mM DTT). Po minimálne hodinovom inkubovaní na ľade sa zmes centrifigovala pri 3500 otáčkach/min v Beckman GS-6R centrifúge a supernatan sa odstránil. Pelet sa resuspendoval v "resuspendačnom tlmivom roztoku" (50mM Tris pH 8,1, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 2mM DTT) použitím malej plastickej jednorazovej pipety. Zmes sa potom centrifigovala pri 8000 otáčkach/min na Beckman J2-21 centrifúge a supernatant sa odstránil. Pelet sa potom resuspendoval v "guanidínovom tlmivom roztoku" (50mM Tris pH 8,1, 6,0M guanidín-HCl, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 10mM DTT) použitím ručne ovládaného homogenizátora. Po centrifugácii s nízkou rýchlosťou na odstránenie nerozpustného materiálu sa supernatant rozdelil na alikvoty a uskladnil pri -70 °C. Rutinne sa získaval výťažok približne 100 mg na liter bakteriálnej kultúry.

SDS-PAGE analýza prípravku purifikovaných inklúzných teliesok sa dosiahla nariadením 2 µl prípravku inklúzných teliesok v guanidínovom tlmivom roztoku spolu s SDS-PAGE vzorkovým tlmivým roztokom a nasledovalo zahrievanie na 100 °C počas 2 minút. Vzorky sa naniesli na gél, pričom sa udržiavali stále horúce, aby sa zabránilo precipitácii zmesi guanidínu a SDS počas nanášania. Prostredníctvom Coomassie farbenia SDS-PAGE, ktorá sa uskutočnila týmto spôsobom, sa usúdilo, že proteín inklúzných teliesok purifikovaný týmto spôsobom je čistý na približne 90 % (pozri obrázok 23).

#### Príklad 10

Preskladanie a purifikácia TCRz heterodiméru

Proteíny solubilizované rovnakým dielom v močovine sa ďalej denaturovali v "guanidínovom tlmivom roztoku" (6M guanidín-HCl, 10mM octan sodný pH 5,5, 10mM EDTA, 2mM DTT) pri 37 °C. Zmes proteínov sa injektovala do ľadom schladeného preskladávacieho tlmivého roztoku (100mM Tris pH 8,1, 0,4M L-arginín-HCl, 5M močovina, 5mM redukovaný glutatión, 0,5mM oxidovaný glutatión) do celkovej koncentrácie proteínu 60 mg/l, aby sa zaistilo rýchle zmiešanie. Po najmenej 5 hodinovom inkubovaní na ľade, aby sa umožnilo preskladanie, sa zmes dialyzovala oproti 10 objemom demineralizovanej vody 24 hodín a potom oproti 10 objemom 10mM Tris pH 8,1 24 hodín.

Dialyzovaný preskladávaný proteín sa potom filtroval, aby sa odstránil agregovaný proteín (produkovaný ako vedľajší produkt počas preskladávania) cez 0,45 $\mu$ m nitrocelulózovú membránu (Whatman). Purifikácia rozpustného TCR s biotínovým príveskom sa potom uskutočňovala nanosením na POROS 20HQ kolónu bežiacu na Biocad Sprint systéme. Na jedno kolo sa mohlo naniesť približne 500 ml roztoku preskladávaného proteínu a eluovanie proteínu sa dosiahlo gradientom chloridu sodného v Bis-Tris-propánovom tlmivom roztoku pH 8,0. Proteín sa eloval pri koncentrácii približne 100 mM chloridu sodného a relevantné frakcie sa okamžite schladili na ľade a pridal sa koktejl proteázových inhibítorov. Frakcie sa analyzovali Coomassie-farbenou SDS-PAGE.

#### Príklad 11

Preskladávanie a purifikácia TCRz heterodiméru s biotinylovateľným  $\beta$  reťazcom

TCR  $\beta$  reťazce s biotínovým príveskom sa zmiešali s rovnakým množstvom  $\alpha$  reťazcov exprimovaných a purifikovaných ako rozpustný T bunkový receptor. TCRz- $\beta$ -BT sa preskladal rovnakým spôsobom ako bolo opísané v príklade 10 pre TCRz (pozri obrázok 26).

#### Príklad 12

Biotinylácia rozpustného TCRz-BT s biotínovým príveskom

Frakcie obsahujúce proteín sa zakoncentrovali do 2,5 ml použitím centrifugačných koncentrátorov s hranicou 10K (Ultrafree, Milipore). Tlmivý roztok sa vymenil použitím PD-10 odsoľovacích kolón ekvilibrovaných s 10mM Tris pH 8,1, 5mM NaCl. Ďalej sa pridal koktejl proteázových inhibítorov a proteín sa znova zakoncentroval na približne 1 ml použitím centrifugačných koncentrátorov. Do tohto 1 ml rozpustného TCR s biotínovým prívieskom sa pridali nasledujúce látky: 7,5mM  $MgCl_2$ , 5mM ATP (pH 8,0), 1mM biotín, 2,5  $\mu g/ml$  BirA biotinylačného enzýmu. Biotinylačná reakcia sa potom nechala prebiehať pri laboratórnej teplote (20 až 25 °C) cez noc.

Enzymaticky biotinylovaný rozpustný TCR sa potom oddelil od zvyšného nezreagovaného biotínu gélovou filtráciou na Superdex 200 HR kolóne (Pharmacia), ktorá prebiehala na Pharmacia FPLC systéme (pozri obrázok 27). Kolóna bola ekvilibrovaná s PBS a odoberali sa 1ml frakcie, ktoré sa okamžite schladzovali na ľade a znova boli chránené koktejlom proteázových inhibítorov. Koncentrácia proteínu sa odhadla použitím Coomassie farbiaceho testu (Pierce) a biotinylovaný proteín sa potom uskladnil do jedného mesiaca pri 4 °C a na dlhšie obdobie pri -20 °C.

Účinnosť biotinylačnej reakcie sa skontrolovala použitím Westen blotingu biotinylovaného proteínu. SDS-PAGE prebiehala použitím vyššie opísaných metód, ale namiesto farbenia sa gél blotoval na PVDF membránu (Bio-Rad) použitím SemiPhor polosuchej elektroblotovacej aparatury (Hoefer). Blotovací stĺpec obsahoval 6 vrstiev filtračného papiera (Whatman 4M) postrihaného na veľkosť gélu a nasiaknutého v prenášacom tlmivom roztoku (25mM Tris báza, 150mM glycín), nasledovala PVDF membrána, ktorá bola vopred navlhčená metanolom a potom nasiaknutá v prenášacom tlmivom roztoku, nasledoval gél, ktorý bol mierne kolísaný v prenášacom roztoku 5 minút, a nasledovalo 6 ďalších vrstiev nasiaknutého filtračného papiera. Stĺpec sa jemne stlačil, pričom sa použila skúmavka, aby sa vytlačili vzduchové bubliny a pridalo sa ďalších približne 10 ml prenášacieho tlmivého roztoku, aby sa napomohlo prenosu. Katóda sa umiestnila na vrch stĺpca a prúd prechádzal cez aparaturu s konštantnou hodnotou 50 mA

jednu hodinu. Membrána sa potom inkubovala v 2% roztoku želatíny (Bio-Rad) v PBS-T tlivom roztoku (PBS + 0,05% Tween-20) viac ako jednu hodinu pri laboratórnej teplote, pričom sa jemne kolísala. Inkubácie cez noc zahŕňali aj 0,01% azid sodný na inhibíciu rastu baktérií. Membrána sa niekoľko krát (4 až 5) premyla s PBS-T a nasledovalo farbenie s avidín-HRP konjugátom (Sigma) nariadeným v pomere 1:1000 v 1% roztoku želatíny v PBS-T viac ako 30 minút pri laboratórnej teplote, pričom sa membrána jemne kolísala. Membrána sa potom niekoľko krát (4 až 5) premyla s PBS-T pred tým, ako sa detegovala s Opti-4CN (Bio-Rad). To je reakčné činidlo, ktoré reaguje v prítomnosti HRP a vytvára nerozpustnú modrú farbu, ktorá farbí membránu v mieste, kde je prítomný relevantný proteín, čo vyplýva z prítomnosti naviazaného HRP. Ak je na farbenie použitý avidín-HRP konjugát, vyplýva z toho potom prítomnosť proteínu obsahujúceho biotín.

Obrázok 28 znázorňuje týmto spôsobom uskutočnené bloty niekoľkých biotinylovaných TCRs. Štandardami použitými pre tieto bloty boli biotinylované markery molekulovej hmotnosti so širokým rozsahom (Bio-Rad). Z blotu je zrejmé, že vysoká úroveň biotinylácie TCRs obsahujúcich biotinylačný prívesok, ktoré reagovali s BirA enzýmom...

### Príklad 13

Produkcia biotinylovaných rozpustných MHC-peptidových komplexov

Biotinylované rozpustné MHC-peptidové komplexy sa produkovali ako bolo opísané v príklade 2.

### Príklad 14

Test na špecifickú väzbu medzi rozpustným TCR a MHC-flu-peptidom

TCR molekula, JM22z, je špecifická pre HLA-A2 MHC molekuly prezentujúce imunodominantný antigén pozostávajúci z aminokyselinových zvyškov 58 až 66 (GILGFVFTL) influenza matricového proteínu. Klonovanie, expresia a purifikácia JM22z sú opísané v príkladoch 4, 7, 9 a 10 a na obrázkoch 24 a 25. Interakcie

medzi JM22z a jeho ligand/MHC komplexom (HLA-A2-flu) alebo irelevantnou HLA-A2 peptidovou kombináciou, ktorej produkcia je opísaná v príklade 13, sa analyzovali na Biacore 2000™ povrchovom plazmónovom rezonančnom (SPR) biosenzore. SPR meria zmeny v refraktívnom indexe, ktoré sú vyjadrené ako jednotky odpovede (RU), blízko povrchu senzora v malej tečúcej bunke, čo je princíp, ktorý môže byť použitý na detekciu interakcií receptora a ligandu a na analýzu ich afinity a kinetických parametrov. Sondové tečúce bunky sa pripravili imobilizáciou jednotlivých HLA-A2-peptidových komplexov v oddelených tečúcich bunkách prostredníctvom väzby medzi biotínom prepojeným s  $\beta$ 2m a streptavidínom, ktorý bol chemicky prepojený s aktivovaným povrchom tečúcich buniek. Test sa potom uskutočňoval prechádzaním JM22z na povrchoch rôznych tečúcich buniek s konštantnou rýchlosťou prietoku, pričom sa merala SPR odpoveď. Najprv sa špecificita interakcie overila prechádzaním  $28\mu\text{M}$  JM22z konštantnou prietokovou rýchlosťou  $5\ \mu\text{l}/\text{min}$  na troch rozličných povrchoch; prvý bol pokrytý s 2800 RU HLA-A2-flu, druhý bol pokrytý s 4200 RU HLA-A2, ktorý bol poskladaný s irelevantným peptidom z HIV reverznej transkriptázy (HLA-A-pol: ILKEPVHGV), a tretí bol pokrytý s 4300 RU CD5 (obrázok 29a, vložený výsek). Na definovanie pozadia rezonancie (obrázok 29a) boli použité injekcie rozpustného JM22z s konštantnou prietokovou rýchlosťou a rôznymi koncentraciami na HLA-A2-pol. Hodnoty týchto kontrolných meraní boli subtrahované z hodnôt získaných s HLA-A2-flu (obrázok 29b) a boli použité na výpočet väzobných afínit vyjadrených vo forme disociačnej konštanty,  $K_d$  (obrázok 29c). Stanovilo sa, že  $K_d$  JM22z je  $15 \pm 4\ \mu\text{M}$  ( $n=7$ ) pri  $37\ ^\circ\text{C}$  a  $K_d$  relevantnej MHC molekuly je  $6,6 \pm 2\ \mu\text{M}$  ( $n=3$ ) pri  $25\ ^\circ\text{C}$ . Použitím imobilizovaného TCR v sondovej tečúcej bunke a rozpustného MHC-peptidového komplexu sa stanovila podobná  $K_d$  s hodnotou  $5,6 \pm 4\ \mu\text{M}$  ( $n=3$ ) pri  $25\ ^\circ\text{C}$ . Rýchlosť vzniku interakcie sa stanovila medzi  $6,7 \times 10^4$  a  $6,9 \times 10^4\ \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  pri  $37\ ^\circ\text{C}$ , zatiaľ čo rýchlosť zániku bola  $1,1\ \text{s}^{-1}$  (Willcox, Gao a ďalší 1999).

#### Príklad 15

#### Test špecifickej väzby medzi rozpustným hlodavčím TCR a hlodavčím MHC H2-D<sup>b</sup>-NP

V tomto experimente sme použili hlodavčí TCR, F5, špecifický pre peptid odvodený od influenza vírusového nukleoproteínu (aa.366-374: ASNENMDAM), ktorý je prezentovaný hlodavčou H2-D<sup>b</sup> MHC molekulou (H2-D<sup>b</sup>-NP). Použil sa mierne modifikovaný gén MHC ťažkého reťazca v tom zmysle, že kódoval len aminokyseliny 1 až 280 prirodzeného proteínu plus 13 aminokyselinovú sekvenciu rozoznávanú BirA enzýmom. Výsledný proteín je možné enzymaticky biotinylovať (Shatz 1993; O'Callaghan, Byford a ďalší 1999). SPR analýza na Biacore2000™ SPR biosenzore použitím tohto rozpustného TCR špecifického pre imobilizovaný H2-D<sup>b</sup>-NP ukázala, že sa špecificky viaže na ligand MHC-peptidovú kombináciu (údaje nie sú uvedené).

#### Príklad 16

#### Porovnanie viazania sa biotinylovaného rozpustného tax-TCR s viazaním sa biotinylovaného rozpustného mutantného tax-TCR

Biotinylované rozpustné tax-TCRs boli pripravené ako bolo uvedené v príkladoch 9 až 11 a Biacore 2000 analýza sa uskutočňovala ako bolo uvedené v príklade 14 použitím pMHC komplexov poskladaných buď s influenza matricovým peptidom (GILGFVGTLL) alebo s HTLV tax 11-19 peptidom (LLFGYPVYV). Biotinylované rozpustné TCRs pretekali na všetkých bunkách rýchlosťou 5  $\mu$ /min celkovo 1 minútu. Z obrázka 30 je zrejmé, že na HTLV tax 11-19 peptidový-MHC komplex sa najprv viazal biotinylovaný rozpustný tax-TCR a potom biotinylovaný rozpustný mutantný tax-TCR (A). Ani prirodzený, ani mutantný tax-TCR sa neviazali ani na influenza matricový peptidový-MHC komplex (B/C), ani na OX68 mono-klonálnu protilátkovú kontrolu (D). Z toho sme vyvodili, že tak prirodzený, ako aj mutantný biotinylovaný rozpustný TCR sa jednoznačne viažu účinne a špecificky na tax-pMHC komplex a len veľmi málo sa líšia v stupni viazania sa.

### Príklad 17

Analýza simultánneho viazania sa TCR a CD8 koreceptora na imobilizovaný MHC peptidový komplex

CD8 a CD4 sú povrchové glykoproteíny, o ktorých sa verí, že fungujú ako koreceptory TCRs, pričom sa simultánne viažu na rovnaké MHC molekuly ako TCR. CD8 je charakteristický pre cytotoxické T bunky a viaže sa na MHC molekuly triedy I, zatiaľ čo CD 4 je exprimovaný na T bunkách pomocnej línie a viaže sa na MHC molekuly triedy II. CD8 je dimér pozostávajúci buď z dvoch identických  $\alpha$ -reťazcov, alebo  $\alpha$  a  $\beta$  reťazca. Homodimérna  $\alpha\alpha$ -CD8 molekula bola vyrobená ako je opísané v PCT/GB98/03235 (Gao, Tormo a ďalší 1997; Gao, Gerth a ďalší 1998). V tomto príklade je opísané simultánne viazanie sa molekúl rozpustného TCR a CD8 na imobilizovaný HLA-A2-flu komplex. Ako je vidno na obrázku 31A, väzobná odpoveď bola jednoducho aditívna. Výsledkom subtrahovania hodnôt TCR odpovede (prázdne krúžky) od hodnôt kombinovanej odpovede (čierne krúžky) boli hodnoty (prázdne štvorčky), ktoré boli veľmi blízke hodnote odpovede  $120\mu\text{M}$  samotného CD8 (prázdne trojuholníky). Obrázok 31B znázorňuje, že kinetiky interakcie TCR a MHC-peptidu neboli ovplyvnené simultánnym viazaním sa CD8. Z pozorovaného aditívneho viazania sa vyplýva, že TCR a CD8 sa viažu na MHC peptidový komplex na oddelených styčných miestach. Príklad tiež ilustruje, že v niektorých prípadoch neovplyvňuje špecifické viazanie sa jednej molekuly špecifické viazanie sa inej molekuly, čo je situácia, ktorá sa najväčšou pravdepodobnosťou nebude vyskytovať pri inej kombinácii molekúl.

### Príklad 18

Expresia, skladanie a miestne špecifická biotinylácia rozpustného  $\alpha/\beta$  TCR

#### a) Skonštruovanie TCR $\alpha$ a $\beta$ reťazcov

Rekombinantná rozpustná forma heterodimérnej TCR molekuly sa skonštruovala ako je znázornené na obrázku 36. Každý reťazec pozostáva z

imunoglobulínovej domény vzdialenejšej od membrány a imunoglobulínovej domény, ktorá je bližšie k membráne, pričom tieto domény sú fúzované prostredníctvom krátkeho flexibilného spojovníka s motívom stočenej závitnice, ktorá pomáha stabilizovať heterodimér.

Obrázky 32 až 34 a 38 až 41 znázorňujú DNA kódujúce sekvencie a zodpovedajúce aminokyselinové sekvencie rôznych  $\alpha$  a  $\beta$  reťazcov z TCRs, ktoré majú rôzne špecificity. Tento príklad sa zameriava na TCRs reprezentované sekvenciami na obrázkoch 32 až 34, ale opísané spôsoby sa môžu podobne uskutočňovať aj použitím TCRs znázornených na obrázkoch 38 až 41.

TCR konštantné domény sa skrátli tesne pred cysteínovým zvyškom, ktorý *in vivo* vytvára medzireťazcovú disulfidovú väzbu. Následkom toho sa tieto dva reťazce párujú prostredníctvom nekovalentných kvartérnych kontaktov. Keďže Fos-Jun zipsové peptidové heterodiméry sú tiež schopné vytvárať medzireťazcovú disulfidovú väzbu hneď na N-konci použitého spojovníka (O'Shea a ďalší 1989), predpokladalo sa, že vzájomné zostavenie dvoch reťazcov bude optimálne. Fúzované proteíny musia byť spojené spôsobom, ktorý je kompatibilný s každým z oddelených komponentov, aby sa zabránilo poškodeniu hociktorej zo štruktúr.

cDNA kódujúca alfa a beta reťazce TCR, ktoré sú špecifické pre influenza matricový proteínový 58-66 epitop v HLA-A2, sa získala z V $\beta$ 17+ ľudského CTL klonu (JM22) ukotvenou PCR ako bolo už opísané (Moss a ďalší 1991).

Alfa a beta TCR-zipsové konštrukty, pJM22 $\alpha$ -Jun a pJM22 $\beta$ -Fos, sa oddelene skonštruovali amplifikáciou variabilnej a konštantnej domény každého reťazca použitím štandardnej PCR technológie a priradením produktov na leucínové zipsové domény z eukaryotických transkripčných faktorov Jun a Fos. Ukázalo sa, že tieto sekvencie dlhé 40 aminokyselín špecificky vytvárajú heterodimér, keď sa preskladajú zo syntetických peptidov, bez toho, aby bola potrebná kovalentná medzireťazcová väzba (O'Shea a ďalší 1989).

Primery boli navrhnuté tak, aby obsahovali vysoký obsah AT hneď na 3' konci za iniciačným kodónom (aby bola destabilizovaná sekundárna štruktúra mRNA), a s využitím *E. coli* kodónovej preferencie, aby sa maximalizovala expresia

(Gao a ďalší). Prebytočný cysteín v TCR beta konštantnej doméne sa mutoval na serín, aby sa zaistila prevencia nesprávneho disulfidového viazania počas preskladávania.

Sekvencie fúzovanej DNA a proteínu sú uvedené na obrázkoch 32 a 33. Aby sa umožnila miestne špecifická biotinylácia  $\beta$  reťazca tohto TCR, vniesla sa DNA sekvencia kódujúca takzvaný "biotínový prívesok" na 3' koniec génu exprimujúceho rozpustný V $\beta$ 17. Na vnesenie tohto DNA konštruktu sa použili nasledujúce PCR primery:

5'-GCTCTAGACATATGGGCCAGTGGATTCTGGAGTCAC-3'

a

5'GGGGGAAGCTTAATGCCATTTCGATTTTCTGAGCTTCAAAAATATCGTTCAGAC  
CACCACCGGATCCGTAAGCTGCCAGGATGAACTCTAG-3'

Výsledný PCR produkt sa poštíepil restriknými enzýmami *NdeI* a *HindIII* (New England Biolabs) a ligoval sa s T4 DNA ligázou (New England Biolabs) do vektora pGMT7 (Studier a ďalší, 1990). Obrázok 3 znázorňuje DNA sekvenciu inzertu v tomto konštrukte a odvodenú proteínovú sekvenciu.

#### b) Expresia TCR reťazcov

Expresia a skladanie TCR špecifického pre influenza vírusový matricový peptid prezentovaný na HLA-A\*0201 sa uskutočňoval nasledovne:

TCR  $\alpha$  a  $\beta$  reťazce sa exprimovali oddelene v *E. coli* kmeni BL21DE3pLysS pod kontrolou vektora pGMT7 v TYP médiu (1,6% bako-tryptón, 1,6% kvasnicový extrak, 0,5% NaCl, 0,25% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Expresia sa indukovala v strednej logaritmickej fáze s 0,5mM IPTG a, po 3 až 5 hodinách, sa baktérie zozbierali centrifugáciou. Bakteriálne bunky sa lyzovali resuspendovaním v "lyzačnom tlmivom roztoku" (10mM EDTA, 2mM DTT, 10mM Tris pH 8, 150mM NaCl, 0,5mM PMSF, 0,1 mg/ml lyzozýmu, 10% glycerol) a nasledovalo pridanie 10mM MgCl<sub>2</sub> a 20  $\mu$ g/ml DNázy, 20 minútová inkubácia na ľade a sonifikácia použitím sondového sonifikátora v 10 cykloch po 30 sekúnd. Proteín, v inklúzných telieskach, sa potom purifikoval

niekoľkými premývaniami (zvyčajne tromi) s "Triton tlmivým roztokom" (0,5% Triton X-100, 50mM Tris pH 8, 100mM NaCl, 0,1% azid sodný, 10mM EDTA, 2mM DTT) použitím centrifugácie pri 15000 otáčkach/min 20 minút na usadenie inkúzných teliesok a na ich resuspendovanie sa použil homogenizátor. Detergent sa z prípravku odstránil jedným premytím s 50mM Tris pH 8, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 2mM DTT a proteín sa solubilizoval s "močovínovým tlmivým roztokom" (20mM Tris pH 8, 8M močovina, 10% glycerol, 500mM NaCl, 10mM EDTA, 2mM DTT). Po miešaní cez noc pri 4 °C sa roztok vyčistil centrifugáciou a solubilizovaný proteín sa uskladnil pri -70 °C. Koncentrácia proteínu sa merala Coomassie väzobným testom (Pierce).

#### c) Preskladanie TCR

Proteín solubilizovaný rovnakým dielom v močovine sa ďalej denaturoval v "guanidínovom tlmivom roztoku" (6M guanidín-HCl, 10mM octan sodný pH 5,5, 10mM EDTA, 2mM DTT) pri 37 °C. Tento roztok sa potom pridal do preskladávacieho tlmivého roztoku (5M močovina, 100mM Tris pH 8, 400mM L-arginín, 5mM redukovaný glutatión, 0,5mM oxidovaný glutatión, 0,1mM PMSF) na ľade, aby sa zaistilo rýchle premiešanie. Po viac ako 12 hodinách pri 4 °C sa roztok dialyzoval oproti 10 objemom vody, potom 10 objemom 10mM Tris pH 8, 100mM močoviny. Vo všetkých štádiách sa pridával proteázový inhibítor PMSF, aby sa minimalizovala proteolytická strata biotinylačných prívieskov na TCR.

#### d) Purifikácia TCR

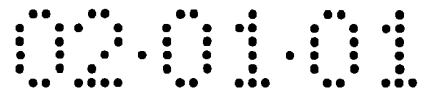
Nariedený roztok TCR sa filtroval cez 0,45 µm filter, aby sa odstránil agregovaný proteín, a potom sa naniesol na POROS 10HQ kolónu. Preskladávaný TCR sa eluoval gradientom chloridu sodného v 10mM Tris pH 8 a izolovali sa 1ml frakcie, ktoré sa analyzovali prostredníctvom SDS-PAGE (pozri obrázok 36). Frakcie obsahujúce TCR sa spojili a zakoncentrovali sa na 1 ml použitím centrifugačného koncentrátora s hranicou 30 kDa.

#### e) Biotinylácia TCR

1 ml TCR roztoku sa upravil tak, že obsahoval 7,5 mM ATP, použitím tlmeného ATP, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM biotínu a pridal sa koktejl proteázových inhibítorov, ktorý obsahoval PMSF, leupeptín a pepstatín. Nakoniec sa pridal enzým BirA do konečnej koncentrácie 5 µg/ml a reakcia sa nechala prebiehať cez noc pri laboratórnej teplote. TCR sa potom oddelil od voľného biotínu gélovou filtráciou (pozri obrázok 37). Frakcie obsahujúce biotinylovaný TCR sa spojili a pridal sa koktejl proteázových inhibítorov. Stanovila sa aj koncentrácia proteínu. Obrázok 35 znázorňuje schematický diagram rozpustného, biotinylovaného TCR.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Preskladaný rekombinantný T bunkový receptor - TCR, ktorý obsahuje:
  - i) rekombinantnú TCR  $\alpha$  alebo  $\gamma$  reťazcovú extracelulárnu doménu, ktorá obsahuje prvý heterológny C-koncový dimerizačný peptid; a
  - ii) rekombinantnú TCR  $\beta$  alebo  $\delta$  reťazcovú extracelulárnu doménu, ktorá obsahuje druhý C-koncový dimerizačný peptid, ktorý vytvára špecifický heterodimér s prvým dimerizačným peptidom na vytvorenie heterodimerizačnej domény, pričom chýba disulfidová väzba, ktorá sa nachádza v prirodzených TCRs pri cytoplazmatickej doméne medzi  $\alpha$  a  $\beta$  alebo medzi  $\gamma$  a  $\delta$  reťazcami.
  
2. Biologicky aktívny rekombinantný T bunkový receptor - TCR, ktorý obsahuje:
  - i) rekombinantnú TCR  $\alpha$  alebo  $\gamma$  reťazcovú extracelulárnu doménu, ktorá obsahuje prvý heterológny C-koncový dimerizačný peptid; a
  - ii) rekombinantnú TCR  $\beta$  alebo  $\delta$  reťazcovú extracelulárnu doménu, ktorá obsahuje druhý C-koncový dimerizačný peptid, ktorý vytvára špecifický heterodimér s prvým dimerizačným peptidom na vytvorenie heterodimerizačnej domény, pričom chýba disulfidová väzba, ktorá sa nachádza v prirodzených TCRs pri cytoplazmatickej doméne medzi  $\alpha$  a  $\beta$  alebo medzi  $\gamma$  a  $\delta$  reťazcami.
  
3. Rekombinantný TCR podľa nároku 1 alebo 2, kde heterodimerizačnou doménou je doména stočeného závitú.
  
4. Rekombinantný TCR podľa nároku 3, kde dimerizačnými peptidmi sú *c-jun* a *c-fos* dimerizačné peptidy.
  
5. Rekombinantný TCR podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4, ktorý obsahuje flexibilný spojovník umiestnený medzi TCR reťazcami a heterodimerizačnými peptidmi.



6. Rekombinantný TCR podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 5, ktorý je exprimovaný v *E. coli* expresnom systéme.

7. Rekombinantný TCR podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 6, ktorý je biotinylovaný na C-konci.

8. Rekombinantný TCR podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 7, ktorý je značený detegovateľnou značkou.

9. Rekombinantný TCR podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8, ktorý je spojený s terapeutickým činidlom, ako napríklad cytotoxickým činidlom, alebo imunostimulačným činidlom.

10. Sekvencie nukleových kyselín, ktoré kódujú rekombinantné TCR reťazce rekombinantného TCR podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8.

11. Sekvencia nukleovej kyseliny podľa nároku 10 v *E. coli* expresnom vektore.

12. Spôsob výroby rekombinantného T bunkového receptora nenaviazaného na membránu, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že zahŕňa expresiu:

i) rekombinantnej TCR  $\alpha$  alebo  $\gamma$  reťazcovej extracelulárnej domény, ktorá obsahuje prvý heterológny C-koncový dimerizačný peptid; a

ii) rekombinantnej TCR  $\beta$  alebo  $\delta$  reťazcovej extracelulárnej domény, ktorá obsahuje druhý C-koncový dimerizačný peptid, ktorý vytvára špecifický heterodimér s prvým dimerizačným peptidom na vytvorenie heterodimerizačnej domény, a spoločné preskladanie reťazcov *in vitro* na vytvorenie TCR heterodiméru.

13. Spôsob podľa nároku 12, vyznačujúci sa tým, že preskladanie sa uskutočňuje v preskladávacom tlmivom roztoku, ktorý obsahuje solubilizačné činidlo.

14. Spôsob podľa nároku 13, vyznačujúci sa tým, že solubilizačným činidlom je močovina s koncentráciou najmenej 0,1 M.

15. Spôsob podľa nároku 14, vyznačujúci sa tým, že solubilizačným činidlom je močovina s koncentráciou približne 5 M.

16. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 12 až 14, vyznačujúci sa tým, že pred preskladávaním sa reťazce denaturujú v denaturačnom tlmivom roztoku.

17. Spôsob podľa nároku 16, vyznačujúci sa tým, že ako redukčné činidlo obsahuje denaturačný tlmivý roztok DTT alebo guanidín.

18. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 12 až 17, vyznačujúci sa tým, že TCR je rekombinantný TCR podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 6.

19. Rekombinantný TCR vyrobený spôsobom podľa ktoréhokoľvek z nárokov 12 až 18.

20. Multimér TCR podľa nároku 19.

## Zoznam sekvencií

<110> Avidex Ltd.

<120> Rozpustný T bunkový receptor

<130> NJL/P21736WO

<140> PCT/GB99/01588

<141> 1999-05-19

<150> GB/9810759.2

<151> 1998-05-19

<160> 85

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: Priamy poly-C "ukotvovaci" primer pre PCR-amplifikáciu cDNAs, ktoré majú na svojom 3'-konci G-zvyšky, použitím terminálnej transferázy. (obrázok 4A)

<400> 1

**taaataactcg aggcgcgccc ccccccccc ccc**

**33**

<210> 2

<211> 48

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: 3'-špecifický primer pre konštantnú oblasť ľudského TCR  $\alpha$  reťazca. (obrázok 4B)

<400> 2

**atataaccgc gggaaccaga tccccacagg aactttctg gctgggga**

**48**

<210> 3

<211> 47

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: 3'-špecifický primer pre konštantnú oblasť ľudského TCR  $\beta$  reťazca.

<400> 3

**atataaccgc gggaaccaga tccccacagt ctgctctacc ccaggcc**

**47**

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: 5'-špecifický PCR primer pre ľudský *c-jun* leucínový zips.

<400> 4

**catacaccgc ggggtagaat cgcccggctg gag** 33

<210> 5

<211> 50

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: 3'-špecifický PCR primer pre ľudský *c-jun* leucínový zips. (obrázok 5B).

<400> 5

**gtgtgtgtctc gaggatccta gtagttcatg actttctgtt taagctgtgc** 50

<210> 6

<211> 39

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: 5'-špecifický PCR primer pre ľudský *c-fos* leucínový zips. (obrázok 5C).

<400> 6

**catacaccgc ggggtctgac tgatacactc caagcggag** 39

<210> 7

<211> 49

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: 3'-špecifický PCR primer pre ľudský *c-fos* leucínový zips. (obrázok 5D).

<400> 7

**tgtgtgtctcg aggatcctag taagctgcca ggatgaactc tagtttttc** 49

<210> 8

<211> 120

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Čiastočná ľudská *c-fos* sekvencia kódujúca leucínovú zipsovú doménu, ako bola fúzovaná s TCR  $\beta$  reťazcami. (obrázok 6B).

<400> 8

**ctgactgata cactccaagc ggagacagac caactagaag atgagaagtc tgctttgcag 60**  
**accgagattg ccaactgct gaaggagaag gaaaaactag agttcatcct ggcagcttac 120**

<210> 9  
 <211> 120  
 <212> DNA  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Čiastočná ľudská *c-jun* sekvencia kódujúca leucínovú zipsovú doménu, ako bola fúzovaná s TCR  $\beta$  reťazcami. (obrázok 6A).

<400> 9  
**agaatcgccc ggctggagga aaaagtgaaa accttgaaag ctcagaactc ggagctggcg 60**  
**tccacggcca acatgctcag ggaacaggtg gcacagctta aacagaaagt catgaactac 120**

<210> 10  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> *C-jun* leucínová zipsová aminokyselinová sekvencia ako bola fúzovaná na TCR  $\alpha$  reťazce. (Obrázok 6A)

<400> 10  
**Arg Ile Ala Arg Leu Glu Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala Gln Asn**  
**1 5 10 15**  
**Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln**  
**20 25 30**  
**Leu Lys Gln Lys Val Met Asn Tyr**  
**35 40**

<210> 11  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Umelá sekvencia

<220>  
 <223> *C-fos* leucínová zipsová aminokyselinová sekvencia ako bola fúzovaná na TCR  $\alpha$  reťazce. (Obrázok 6B).

<400> 11  
**Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala Glu Thr Asp Gln Leu Glu Asp Glu Lys**  
**1 5 10 15**  
**Ser Ala Leu Gln Thr Glu Ile Ala Asn Leu Leu Lys Glu Lys Glu Lys**  
**20 25 30**  
**Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala Tyr**  
**35 40**

<210> 12  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: Priamy PCR primer na mutovanie nespárovaného cysteínu v ľudských TCR  $\beta$  reťazcoch na serín (Obrázok 7A).

<400> 12

**gactccagat acagcctgag cagccg**

26

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: Aminokyselinová sekvencia ľudského TCR  $\beta$  reťazca po mutovaní nespárovaného cysteínu na serín (Obrázok 7A).

<400> 13

**Asp Ser Arg Tyr Ser Leu Ser Ser**  
 1 5

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: Protismerný PCR primer na mutovanie nespárovaného cysteínu v ľudských TCR  $\beta$  reťazcoch na serín (Obrázok 7B).

<400> 14

**cggctgctca ggctgtatct ggagtc**

26

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: Priamy PCR primer na mutovanie nespárovaného cysteínu v ľudských TCR  $\beta$  reťazcoch na alanín (Obrázok 7C).

<400> 15

**gactccagat acgctctgag cagccg**

26

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: Aminokyselinová sekvencia ľudského TCR  $\beta$  reťazca po mutovaní nespárovaného cysteínu na alanín (Obrázok 7C).

<400> 16

**Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser Ser**  
 1 5

<210> 17  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Umelá sekvencia

<220>  
 <223> Opis umelej sekvencie: Protismerný PCR primer na mutovanie nespárovaného cysteínu v ľudských TCR  $\beta$  reťazcoch na alanín (Obrázok 7D).

<400> 17  
**cggctgctca gagcgtatct ggagtc** 26

<210> 18  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> Umelá sekvencia

<220>  
 <223> Opis umelej sekvencie: 5' PCR primer pre ľudský V  $\alpha$ 10.2 reťazec JM22 TCR, ktorý je definovaný Influenza matricovým peptidom prezentovaným na HLA-A0201. (Obrázok 9A).

<400> 18  
**gctctagaca tatgcaacta ctagaacaaa gtcctcagtt tctaagcatc caagagg** 57

<210> 19  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Nová N-koncová aminokyselinová sekvencia skráteneho V  $\alpha$ 10.2 reťazca ľudského JM22 TCR, ktorý je definovaný Influenza matricovým peptidom prezentovaným na HLA-A0201. (Obrázok 9A).

<400> 19  
**Met Gln Leu Leu Glu Gln Ser Pro Gln Phe Leu Ser Ile Gln Glu**  
 1 5 10 15

<210> 20  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Umelá sekvencia

<220>  
 <223> Opis umelej sekvencie: 5' PCR primer pre ľudský V  $\beta$ 17 reťazec JM22 TCR, ktorý je definovaný Influenza matricovým peptidom prezentovaným na HLA-A0201. (Obrázok 9B)

<400> 20  
**gctctagaca tatgggtggat ggtggaatca etcagtc** 39

<210> 21  
 <211> 9  
 <212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Nová N-koncová aminokyselinová sekvencia skráteného V  $\beta$ 17 reťazca ľudského JM22 TCR, ktorý je definovaný Influenza matricovým peptidom prezentovaným na HLA-A0201. (Obrázok 9B).

<220>

<223> Nová N-koncová aminokyselinová sekvencia skráteného V  $\beta$ 17 reťazca ľudského JM22 TCR, ktorý je definovaný Influenza matricovým peptidom prezentovaným na HLA-A0201. (Obrázok 9A)

<400> 21

**Met Val Asp Gly Gly Ile Thr Gln Ser**  
 1 5

<210> 22

<211> 57

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: 5' PCR primer pre myši V  $\alpha$ 4 reťazec TCR, ktorý je definovaný Influenza nukleoproteínovým peptidom prezentovaným na H2Db. (Obrázok 9C).

<400> 22

**gctctagaca tatggattct gttactcaaa tgcaaggctca agtgaccctc tcatcag 57**

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: Nová N-koncová aminokyselinová sekvencia skráteného V  $\alpha$ 4 reťazca myšieho TCR, ktorý je definovaný Influenza nukleoproteínovým peptidom prezentovaným na H2-Db. (Obrázok 9C).

<400> 23

**Met Asp Ser Val Thr Gln Met Gln Gly Gln Val Thr Leu Ser Ser**  
 1 5 10 15

<210> 24

<211> 53

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<220>

<223> 5' PCR primer pre myši V  $\beta$  11 reťazec TCR, ktorý je definovaný Influenza nukleoproteínovým peptidom prezentovaným na H2Db. (Obrázok 9D).

<400> 24

**gctctagaca tatggaacca acaaatgctg gtgttatcca aacacctagg cac 53**

<210> 25



<223> Nová N-koncová aminokyselinová sekvencia skráteneho V $\beta$ 5.1 TCR, ktorý je definovaný 003 HIV-1 Gag peptidom prezentovaným na HLA-A0201. (Obrázok 9F).

<400> 29

**Met Lys Ala Gly Val Thr Gln Thr**  
 1 5

<210> 30

<211> 33

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> 5' PCR primer pre ľudský V $\alpha$ 2.3 reťazec A6 TCR, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax peptidom prezentovaným na HLA-A0201. (Obrázok 9G).

<400> 30

**ccccccata tgcagaagga agtggagcag aac**

**33**

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Nová N-koncová aminokyselinová sekvencia skráteneho ľudského V  $\alpha$  2.3 reťazca A6 TCR, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax peptidom prezentovaným na HLA-A0201. (Obrázok 9G).

<400> 31

**Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Lys**  
 1 5

<210> 32

<211> 33

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> 5' PCR primer pre ľudský V $\beta$ 12.3 reťazec A6 TCR, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax peptidom prezentovaným na HLA-A0201. (Obrázok 9H).

<400> 32

**ccccccata tgaacgctgg tgtcactcag acc**

**33**

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Nová N-koncová aminokyselinová sekvencia skráteneho ľudského V $\beta$ 12.3 reťazca A6 TCR, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax peptidom prezentovaným na HLA-A0201. (Obrázok 9H).

<400> 33

**Met Lys Ala Gly Val Thr Gln Thr**  
 1 5

<210> 34  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> 5' PRC

<220>  
 <223> 5' PCR primer pre ľudský V $\alpha$ 17.2 reťazec B7 TCR, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax peptidom prezentovaným na HLA-A0201. (Obrázok 9I).

<400> 34  
**ccccccata tgcaacaaaa aatgatgac cagcaagtta agcaaat** 48

<210> 35  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Nová N-koncová aminokyselinová sekvencia skráteného ľudského V $\alpha$ 17.2 reťazca B7 TCR, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax peptidom prezentovaným na HLA-A0201. (Obrázok 9I).

<400> 35  
**Met Gln Gln Lys Asn Asp Asp Gln Gln Val Lys Gln Asn**  
 1 5 10

<210> 36  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> 5' PCR primer pre ľudský V $\beta$ 12.3 reťazce B7 TCR, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax peptidom prezentovaným na HLA-A0201. (Obrázok 9J)

<400> 36  
**ccccccata tgaacgctgg tgtcactcag accccaaaat tccag** 45

<210> 37  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> Nová N-koncová aminokyselinová sekvencia skráteného ľudského V $\beta$ 12.3 reťazca B7 TCR, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax peptidom prezentovaným na HLA-A0201. (Obrázok 9J).

<400> 37  
**Met Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln**  
 1 5 10

<210> 38  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> 3' PCR primer pre ľudské C $\alpha$  reťazce, ktorý je všeobecne použiteľný.  
 (Obrázok 9K).

<400> 38  
**catcaccccg ggggaacttt ctgggctggg gaagaagg 38**

<210> 39  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> 3' PCR primer pre ľudské C $\beta$  reťazce, ktorý je všeobecne použiteľný.  
 (Obrázok 9L).

<400> 39  
**catcaccccg gggctctgctc taccacagc ctc 33**

<210> 40  
 <211> 744  
 <212> DNA  
 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Mutovaná DNA sekvencia rozpustného HLA-A2/flu matricou definovaného  
 TCR  $\alpha$  reťazca z JM22, ako je fúzaná na "leucínovú zipsovú" doménu  
 c-jun.  
 (Obrázok 10).

<400> 40  
**atgcaactac tagaacaag tcctcagttt ctaagcatcc aagagggaga aaatctcact 60**  
**gtgtactgca actcctcaag tgttttttcc agcttacaat ggtacagaca ggagcctggg 120**  
**gaaggtcctg tcctcctggg gacagtagtt acgggtggag aagtgaagaa gctgaagaga 180**  
**ctaacccttc agtttggtga tgcaagaaag gacagttctc tccacatcac tgccggcccag 240**  
**cctgggtgata caggcctcta cctctgtgca ggagcgggaa gccaaaggaaa tctcatcttt 300**  
**ggaaaaggca ctaaactctc tgttaaacca aatatccaga accctgaccc tgccgtgtac 360**  
**cagctgagag actctaaatc cagtgacaag tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct 420**  
**caaacaaatg tgtcacaag taaggattct gatgtgtata tcacagacaa aactgtgcta 480**  
**gacatgaggt ctatggactt caagagcaac agtgctgtgg cctggagcaa caaatctgac 540**  
**tttgcattgt caaacgcctt caacaacagc attattccag aagacacctt cttccccagc 600**  
**ccagaaagtt cccccggggg tagaatcgcc cggctggagg aaaaagtgaa aaccttgaaa 660**  
**gctcagaact cggagctggc gtccacggcc aacatgctca gggaacaggt ggcacagctt 720**  
**aaacagaaag tcatgaacta ctag 744**

<210> 41  
 <211> 247  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Predpokladaná aminokyselinová sekvencia rozpustného HLA-A2/flu matricou definovaného  $\alpha$  reťazca z JM22, ako je fúzovaná na "leucínovú zipsovú" doménu *c-jun*. (Obrázok 10).

<400> 41

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

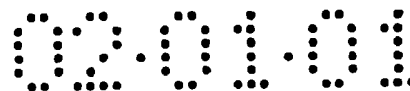
<210> 42

<211> 864

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>



<223> DNA sekvencia rozpustného HLA-A2/flu definovaného TCR  $\beta$  reťazca z JM22, ako je fúzovaná na "leucínovú zipsovú" doménu *c-fos*. (Obrázok 11).

<400> 42

```
atggtggatg gtggaatcac tcagtcccca aagtacctgt tcagaaagga aggacagaat 60
gtgaccctga gttgtgaaca gaatttgaac cacgatgcca tgtactggta ccgacaggac 120
ccagggcaag ggctgagatt gatctactac tcacagatag taaatgactt tcagaaagga 180
gatatagctg aagggtagag cgtctctcgg gagaagaagg aatcctttcc tctcactgtg 240
acatcggccc aaaagaaccc gacagctttc tatctctgtg ccagtagttc gaggagctcc 300
tacgagcagt acttcggggcc gggcaccagg ctcacgggtca cagaggacct gaaaaacgtt 360
ttcccacccg aggtcgctgt gtttgaacca tcagaagcag agatctcca cacccaaaag 420
gccacactgg tgtgcctggc cacaggcttc taccctgacc acgtggagct gagctggtgg 480
gtgaatggga aggaggtgca cagtggggtc agcacagacc cgcagcccct caaggagcag 540
cccgccctca atgactccag atactgctg agcagccgcc tgagggtctc ggccaccttc 600
tggcagaacc cccgcaacca cttccgctgt caagtccagt tctacgggct ctcggagaat 660
gacgagtgga cccaggatag ggccaaacct gtcaccaga tcgtcagcgc cgaggcctgg 720
ggtagagcag accccggggg tctgactgat aactccaag cggagacaga tcaacttgaa 780
gacaagaagt ctgcgttgca gaccgagatt gccaatctac tgaaagagaa ggaaaaacta 840
gagttcatcc tggcagctta ctag 864
```

<210> 43

<211> 287

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Predpokladaná aminokyselinová sekvencia rozpustného HLA-A2/flu matricou definovaného  $\beta$  reťazca z JM22, ako je fúzovaná na "leucínovú zipsovú" doménu *c-fos*. (Obrázok 11).

<400> 43

```
Met Val Asp Gly Gly Ile Thr Gln Ser Pro Lys Tyr Leu Phe Arg Lys
 1 5 10 15
Glu Gly Gln Asn Val Thr Leu Ser Cys Glu Gln Asn Leu Asn His Asp
 20 25 30
Ala Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile
 35 40 45
Tyr Tyr Ser Gln Ile Val Asn Asp Phe Gln Lys Gly Asp Ile Ala Glu
 50 55 60
Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Ser Phe Pro Leu Thr Val
 65 70 75 80
Thr Ser Ala Gln Lys Asn Pro Thr Ala Phe Tyr Leu Cys Ala Ser Ser
 85 90 95
Ser Arg Ser Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr
 100 105 110
Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe
 115 120 125
Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val
 130 135 140
```

Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp  
 145 150 155 160  
 Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro  
 165 170 175  
 Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser  
 180 185 190  
 Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe  
 195 200 205  
 Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr  
 210 215 220  
 Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp  
 225 230 235 240  
 Gly Arg Ala Asp Pro Gly Gly Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala Glu Thr  
 245 250 255  
 Asp Gln Leu Glu Asp Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr Glu Ile Ala Asn  
 260 265 270  
 Leu Leu Lys Glu Lys Glu Lys Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala Tyr  
 275 280 285

<210> 44  
 <211> 795  
 <212> DNA  
 <213> Umelá sekvencia

<220>  
 <223> DNA sekvencia rozpustného H2-Db/Influenza vírusovým nukleoproteínom  
 definovaného TCR  $\alpha$  reťazca z hlodavčieho F5 receptora, ako je  
 fúzovaná s "leucínovou zipsovou" doménou *c-jun*. (Obrázok 12).

<220>  
 <223> Opis umelej sekvencie: Fúzovaný gén kódujúci skráteneý hlodavčí F5  
 TCR  $\alpha$  reťazec fúzovaný s leucínovou zipsovou doménou ľudského *c-jun*.

<400> 44  
 atgaactatt ctccagcttt agtgactgtg atgctgtttg tgtttgggag gacccatgga 60  
 gactcagtaa cccagatgca aggtcaagtg accctctcag aagacgactt cctatttata 120  
 aactgtactt attcaaccac atggtaccgg actcttttct ggtatgtcca atatcctgga 180  
 gaagggtccac agctcctttt gaaagtcaca acagccaaca acaaggggaat cagcagaggt 240  
 tttgaagcta catatgataa aggaacaacg tccttccact tgcagaaagc ctcagtgagc 300  
 gagtcagact ctgctgtgta ctactgtgtg ctgggtgatc gacagggagg cagagctctg 360  
 atatttgtaa caggaaccac ggtatcagtc agccccaaca tccagaacct agaacctgct 420  
 gtgtaccagt taaaagatcc tgggtctcag gacagcacc tctgctgtt caccgacttt 480  
 gactcccaaa tcaatgtgcc gaaaaccatg gaatctggaa cgttcatcac tgacaaaact 540  
 gtgctggaca tgaaagctat ggattccaag agcaatgggg ccattgcctg gagcaaccag 600  
 acaagcttca cctgccaaga tatctcaaaa gagaccaacg ccacctacc cagttcagac 660  
 gttcccgggg gtagaatcgc cgggctggag gaaaaagtga aaaccttgaa agctcagaac 720  
 tcggagctgg cgtccacggc caacatgctc agggaacagg tggcacagct taaacagaaa 780  
 gtcattgaact actag 795

<210> 45

<211> 264  
 <212> PRT  
 <213> Umelá sekvencia

<220>  
 <223> Predpokladaná aminokyselinová sekvencia rozpustného H2-Db/Influenza vírusovým nukleoproteínom definovaného  $\alpha$  reťazca z hlodavčieho F5 receptora, ako je fúzovaná s "leucínovou zipsovou" doménou *c-jun*. (Obrázok 12).

<220>  
 <223> Opis umelej sekvencie: Fúzovaný proteín pozostávajúci zo skráteného hlodavčieho F5 TCR  $\alpha$  reťazca fúzovaného s leucínovou zipsovou doménou ľudského *c-jun*.

<400> 45

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

Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln  
 245 250 255

Leu Lys Gln Lys Val Met Asn Tyr  
 260

<210> 46  
 <211> 864  
 <212> DNA  
 <213> Umelá sekvencia

<220>  
 <223> DNA sekvencia rozpustného H2-Db/Influenza vírusovým nukleoproteínom definovaného TCR  $\beta$  reťazca z hlodavčieho F5 receptora, ako je fúzovaná s "leucínovou zipsovou" doménou *c-fos*. (Obrázok 13).

<220>  
 <223> Opis umelej sekvencie: Sekvencia rozpustného H2-db/Influenza vírusovým nukleoproteínom definovaného TCR  $\beta$  reťazca z hlodavčieho F5 receptora, ako je fúzovaná s leucínovou zipsovou doménou ľudského *c-fos*.

<400> 46  
 atgaaagctg gagttactca aactccaaga tatotgatca aaacgagagg acagcaagtg 60  
 aactgagct gctcccctat ctctgggatc aggagtgtat cctggtacca acagaccca 120  
 ggacagggcc ttcagttcct ctttgaatac ttcagtgaga cacagagaaa caaggaaac 180  
 ttccctggtc gattotcagg ggcagcttc tctaactctc gctctgagat gaatgtgagc 240  
 accttgagc tgggggactc ggccctttat ctttgcgcca gcagcttcga cagcgggaat 300  
 tcaccctcc actttgggaa cgggaccagg ctactgtga cagaggacct gaacaagtg 360  
 ttcccaccgc aggtcgctgt gtttgagcca tcagaagcag agatctcca cacccaaaag 420  
 gccacactgg tgtgcctggc cacaggcttc ttccctgacc acgtggagct gagctggtgg 480  
 gtgaatggga aggaggtgca cagtggggtc agccaggacc cgcagcccct caaggagcag 540  
 cccgccctca atgactccag atacagcctg agcagccgcc tgaggggtctc ggccaccttc 600  
 tggcagaacc cccgcaacca cttccgctgt caagtccagt tctacgggct ctcggagaat 660  
 gacgagtgga cccaggatag ggccaaacct gtcaccacaga tcgtcagcgc cgaggcctgg 720  
 ggtagagcag accccggggg tctgactgat aactccaag cggagacaga tcaacttgaa 780  
 gacaagaagt ctgcgcttga gaccgagatt gccaatctac tgaaagagaa ggaaaaacta 840  
 gagttcatcc tggcagctta ctag 864

<210> 47  
 <211> 287  
 <212> PRT  
 <213> Umelá sekvencia

<220>  
 <223> Aminokyselinová sekvencia rozpustného H2-Db/Influenza vírusovým nukleoproteínom definovaného TCR  $\beta$  reťazca z hlodavčieho F5 receptora, ako je fúzovaná s leucínovou zipsovou doménou *c-fos*. (Obrázok 13).

<400> 47  
 Met Lys Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Ile Lys Thr Arg  
 1 5 10 15  
 Gly Gln Gln Val Thr Leu Ser Cys Ser Pro Ile Ser Gly His Arg Ser  
 20 25 30

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

<210> 48

<211> 747

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> DNA sekvencia TCR $\alpha$  reťazca, ktorý je definovaný HLA-A2/HIV-1 Gag od pacienta 003r, ako je fúzovaná s leucínovou zipsovou doménou *c-jun*. (Obrázok 14).

&lt;220&gt;

<223> Opis umelej sekvencie: DNA sekvencia TCR $\alpha$  reťazca, ktorý je definovaný HLA-A2/HIV-1 Gag od pacienta 003r, ako je fúzovaná s leucínovou zipsovou doménou *c-jun*.

&lt;400&gt; 48

```

atgaaacaag aagttacaca gattcctgca gctctgagtg tcccagaagg agaaaacttg 60
gtttcacaact gcagtttcac tgatagcgct atttacaacc tccagtgggt taggcaggac 120
cctgggaaaag gtctcacatc tctgttgctt attcagtcaa gtcagagaga gcaacaagt 180
ggaagactta atgcctcgct ggataaatca tcaggacgta gtactttata cattgcagct 240
tctcagcctg gtgactcagc cacctacctc tgtgctgtga ccaacttcaa caaattttac 300
tttggatctg ggaccaaact caatgtaaaa ccaaatatcc agaaccctga ccctgccgtg 360
taccagctga gagactctaa atccagtgc aagtctgtct gcctattcac cgattttgat 420
tctcaaacaa atgtgtcaca aagtaaggat tctgatgtgt atatcacaga caaaactgtg 480
ctagacatga ggtctatgga cttcaagagc aacagtgtct tggcctggag caacaaatct 540
gactttgcat gtgcaaacgc cttcaacaac agcattattc cagaagacac cttcttcccc 600
agcccagaaa gttcccccg gggtagaatc gcccggtgg aggaaaaagt gaaaaccttg 660
aaagctcaga actcggagct ggcgtccacg gccaacatgc tcagggaaca ggtggcacag 720
cttaaacaga aagtcatgaa ctactag 747

```

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 248

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umeľá sekvencia

&lt;220&gt;

<223> Opis umelej sekvencie: Aminokyselinová sekvencia TCR $\alpha$  reťazca, ktorý je definovaný HLA-A2/HIV-1 Gag od pacienta 003r, ako je fúzovaná s leucínovou zipsovou doménou *c-jun*. Obrázok 14.

&lt;400&gt; 49

```

Met Lys Gln Glu Val Thr Gln Ile Pro Ala Ala Leu Ser Val Pro Glu
 1                5                10                15

Gly Glu Asn Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr
      20                25                30

Asn Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu
      35                40                45

Leu Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn
      50                55                60

Ala Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Ala Ala
      65                70                75                80

Ser Gln Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Thr Asn Phe
      85                90                95

Asn Lys Phe Tyr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Asn Val Lys Pro Asn
      100                105                110

Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser
      115                120                125

Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn
      130                135                140

Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val

```

145		150		155		160
Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp		165		170		175
Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile	180		185		190	
Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Pro Gly Gly	195		200		205	
Arg Ile Ala Arg Leu Glu Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala Gln Asn	210		215		220	
Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln	225		230		235	240
Leu Lys Gln Lys Val Met Asn Tyr		245				

<210> 50  
 <211> 864  
 <212> DNA  
 <213> Umeľá sekvencia

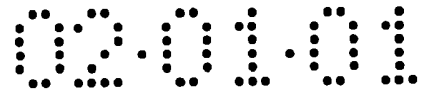
<220>  
 <223> Opis umelej sekvencie: DNA sekvencia TCR $\beta$  reťazca, ktorý je definovaný HLA-A2/HIV-1 Gag od pacienta 003r, ako je fúzovaná s leucínovou zipsovou doménou *c-fos*. Obrázok 15.

<400> 50  
 atgaaagctg gagttactca aactccaaga tatctgatca aaacgagagg acagcaagtg 60  
 acactgagct gctccccat ctctgggcat aggagtgtat cctggtacca acagacccca 120  
 ggacagggcc ttcagttcct ctttgaatac ttcagtgaga cacagagaaa caaaggaaac 180  
 ttccctggtc gattctcagg ggcaccgttc tctaactctc gctctgagat gaatgtgagc 240  
 accttgagc tgggggactc ggccctttat ctttgcgcca gcagcttcga cagcgggaat 300  
 tcaccctcc actttgggaa cgggaccagg ctactgtga cagaggacct gaacaagggtg 360  
 tccccaccg aggtcgctgt gtttgagcca tcagaagcag agatctcca cacccaaaag 420  
 gccacactgg tgtgcctggc cacaggcttc ttccctgacc acgtggagct gagctgggtg 480  
 gtgaatggga aggaggtgca cagtggggtc agccaggacc cgcagccct caaggagcag 540  
 cccgccctca atgactccag atacagcctg agcagccgcc tgagggtctc ggccaccttc 600  
 tggcagaacc cccgcaacca cttccgctgt caagtccagt tctacgggt ctcggagaat 660  
 gacgagtgga cccagatag ggccaaacct gtcaccaga tcgtcagcgc cgaggcctgg 720  
 ggtagagcag accccggggg tctgactgat acactccaag cggagacaga tcaacttgaa 780  
 gacaagaagt ctgctgtgca gaccgagatt gccaatctac tgaaagagaa ggaaaaacta 840  
 gagttcatcc tggcagctta ctag 864

<210> 51  
 <211> 287  
 <212> PRT  
 <213> Umeľá sekvencia

<220>  
 <223> Opis umelej sekvencie: Aminokyselinová sekvencia TCR $\beta$  reťazca, ktorý je definovaný HLA-A2/HIV-1 Gag od pacienta 003r, ako je fúzovaná s leucínovou zipsovou doménou *c-fos*. Obrázok 15.

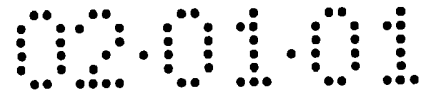
<400> 51



- 83 -

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

<210> 52  
<211> 750  
<212> DNA  
<213> Umelá sekvencia



<220>

<223> Opis umelej sekvencie: DNA sekvencia rozpustného TCR  $\alpha$  reťazca z klonu A6, ktorý je definovaný HTLV1 Tax prezentovaným na HLA-A2, ako je fúzovaná s leucínovou zipsovou doménou *c-jun*. OBRÁZOK 16.

<400> 52

```

atgcagaagg aagtggagca gaactctgga cccctcagtg ttccagaggg agccattgcc 60
tctctcaact gcacttacag tgaccgaggt tcccagtcct tcttctggta cagacaatat 120
tctgggaaaa gccctgagtt gataatgtcc atatactcca atggtgacaa agaagatgga 180
aggtttacag cacagctcaa taaagccagc cagtatgttt ctctgctcat cagagactcc 240
cagcccagtg attcagccac ctacctctgt gccgttacia ctgacagctg ggggaaattg 300
cagtttggag cagggaccca ggttgtggtc accccagata tccagaacct tgaccctgcc 360
gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg tctgcctatt caccgatttt 420
gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg tgtatatcac agacaaaact 480
gtgctagaca tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaaa 540
tctgactttg catgtgcaaa cgcottcaac aacagcatta ttccagaaga caccttcttc 600
cccagcccag aaagttcccc cgggggtaga atcggccggc tggaggaaaa agtgaaaacc 660
ttgaaagctc agaactogga gctggcgtcc acggccaaca tgctcagggg acaggtggca 720
cagcttaaac agaaagtcac gaactactag                                     750

```

<210> 53

<211> 249

<212> PRT

<213> Umeľá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: Aminokyselinová sekvencia rozpustného TCR  $\alpha$  reťazca z klonu A6, ktorý je definovaný HTLV1 Tax prezentovaným na HLA-A2, ako je fúzovaná s leucínovou zipsovou doménou *c-jun*. OBRÁZOK 16.

<400> 53

```

Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu
 1                               5                               10                               15

Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln
 20                               25                               30

Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile
 35                               40                               45

Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala
 50                               55                               60

Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser
 65                               70                               75

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Thr Thr Asp Ser
 85                               90                               95

Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro
100                               105                               110

Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
115                               120                               125

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
130                               135                               140

```

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr  
 145 150 155 160  
 Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala  
 165 170 175  
 Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser  
 180 185 190  
 Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Pro Gly  
 195 200 205  
 Gly Arg Ile Ala Arg Leu Glu Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala Gln  
 210 215 220  
 Asn Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala  
 225 230 235 240  
 Gln Leu Lys Gln Lys Val Met Asn Tyr  
 245

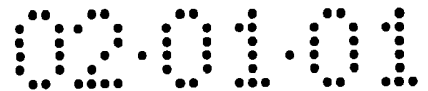
<210> 54  
 <211> 928  
 <212> DNA  
 <213> Umelá sekvencia

<220>  
 <223> Opis umelej sekvencie: DNA sekvencia rozpustného TCR  $\beta$  reťazca z klonu A6, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax prezentovaným na HLA-A2, ako je fúzovaná s leucínovou zipsovou doménou *c-fos* a BirA biotinylačným prívieskom.

<400> 54  
 atgaacgctg gtgtcactca gaccccaaaa ttccaggctc tgaagacagc acagagcatg 60  
 acactgcagt gtgccagga tatgaaccat gaatacatgt cctggtatcg acaagaccca 120  
 ggcatggggc tgaggctgat tcattactca gttggtgctg gtatcactga ccaaggagaa 180  
 gtccccaatg gctacaatgt ctccagatca accacagagg atttcccgct caggctgctg 240  
 tgggctgctc cctccagac atctgtgtac ttctgtgcca gcaggccggg actagcggga 300  
 gggcgaccag agcagtactt cgggcccggc accaggctca cggtcacaga ggacctgaaa 360  
 aacgtgttcc caccgaggt cgctgtgttt gagccatcag aagcagagat ctcccacacc 420  
 caaaaggcca cactgggtgtg cctggccaca ggcttctacc cggaccagt ggagctgagc 480  
 tgggtgggtga atgggaagga ggtgcacagt ggggtcagca cagaccgca gccctcaag 540  
 gagcagcccg ccctcaatga ctccagatac gctctgagca gccgcctgag ggtctcggcc 600  
 accttctggc agaacccccg caaccacttc cgctgtcaag tccagttcta cgggctctcg 660  
 gagaatgacg agtggaccca ggatagggcc aaacctgtca cccagatcgt cagcggcag 720  
 gcctggggta gagcagaccc cgggggtctg actgatacac tccaagcga gacagatcaa 780  
 cttgaagaca agaagtctgc gttgcagacc gagattgcca atctactgaa agagaaggaa 840  
 aaactagagt tcatcctggc agcttacgga tccgggtggtg gtctgaacga tatttttgaa 900  
 gctcagaaaa tcgaatggca ttaagctt 928

<210> 55  
 <211> 307  
 <212> PRT  
 <213> Umelá sekvencia

<220>  
 <223> Opis umelej sekvencie: Aminokyselinová sekvencia rozpustného TCR  $\beta$  reťazca z klonu A6, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax prezentovaným na



HLA-A2, ako je fúzovaná s leucinovou zipsovou doménou *c-fos* a BirA biotinylačným prívieskom.

<400> 55

Met	Asn	Ala	Gly	Val	Thr	Gln	Thr	Pro	Lys	Phe	Gln	Val	Leu	Lys	Thr
1				5					10					15	
Gly	Gln	Ser	Met	Thr	Leu	Gln	Cys	Ala	Gln	Asp	Met	Asn	His	Glu	Tyr
			20					25					30		
Met	Ser	Trp	Tyr	Arg	Gln	Asp	Pro	Gly	Met	Gly	Leu	Arg	Leu	Ile	His
		35					40					45			
Tyr	Ser	Val	Gly	Ala	Gly	Ile	Thr	Asp	Gln	Gly	Glu	Val	Pro	Asn	Gly
	50					55					60				
Tyr	Asn	Val	Ser	Arg	Ser	Thr	Thr	Glu	Asp	Phe	Pro	Leu	Arg	Leu	Leu
65					70					75					80
Ser	Ala	Ala	Pro	Ser	Gln	Thr	Ser	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Ser	Arg	Pro
				85					90					95	
Gly	Leu	Ala	Gly	Gly	Arg	Pro	Glu	Gln	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Arg
			100					105						110	
Leu	Thr	Val	Thr	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala
		115					120						125		
Val	Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr
		130				135						140			
Leu	Val	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser
145					150					155					160
Trp	Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Ser	Thr	Asp	Pro
				165					170					175	
Gln	Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Ala	Leu
			180					185						190	
Ser	Ser	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn
		195					200						205		
His	Phe	Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu
	210					215					220				
Trp	Thr	Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu
225					230					235					240
Ala	Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Pro	Gly	Gly	Leu	Thr	Asp	Thr	Leu	Gln	Ala
				245					250						255
Glu	Thr	Asp	Gln	Leu	Glu	Asp	Lys	Lys	Ser	Ala	Leu	Gln	Thr	Glu	Ile
			260					265					270		
Ala	Asn	Leu	Leu	Lys	Glu	Lys	Glu	Lys	Leu	Glu	Phe	Ile	Leu	Ala	Ala
		275					280					285			
Tyr	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Asn	Asp	Ile	Phe	Glu	Ala	Gln	Lys	Ile
	290					295						300			

Glu Trp His  
305

<210> 56  
<211> 765  
<212> DNA  
<213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Opis umelej sekvencie: DNA sekvencia rozpustného HLA-A2/HTLV-1 Tax definovaného TCR  $\alpha$  reťazca z klonu M10B7/D3 fúzovaná s *c-jun* leucínovou zipsovou doménou.

<400> 56  
atgcaacaga agaatgatga ccagcaagtt aagcaaaatt caccatccct gagcgtccag 60  
gaaggaagaa tttctattct gaactgtgac tatactaaca gcatgtttga ttatttcccta 120  
tgggtacaaaa aataccctgc tgaaggtcct acattcctga tatctataag ttocattaag 180  
gataaaaatg aagatggaag attcactgtc ttcttaaca aaagtgcaa gcacctctct 240  
ctgcacattg tgccctccca gcctggagac tctgcagtgt acttctgtgc agcaatggag 300  
ggagcccaga agctgggtatt tggccaagga accaggctga ctatcaaccc aaatatccag 360  
aaccctgacc ctgccgtgta ccagctgaga gactctaaat ccagtgacaa gtctgtctgc 420  
ctattcaccg attttgattc tcaaacaaat gtgtcacaaa gtaaggattc tgatgtgat 480  
atcacagaca aaactgtgct agacatgagg tctatggact tcaagagcaa cagtgtctgtg 540  
gcctggagca acaaatctga ctttgcattg gcaaacgcct tcaacaacag cattattcca 600  
gaagacacct tcttccccag cccagaaagt tccccgggg gtagaatcgc cgggctggag 660  
gaaaaagtga aaaccttgaa agctcagaac tcggagctgg cgtccacggc caacatgctc 720  
agggaacagg tggcacagct taaacagaaa gtcatgaact actag 765

<210> 57  
<211> 254  
<212> PRT  
<213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Opis umelej sekvencie: Aminokyselinová sekvencia rozpustného HLA-A2/HTLV-1 Tax definovaného TCR  $\alpha$  reťazca z klonu M10B7/D3 fúzovaná s *c-jun* leucínovou zipsovou doménou.

<400> 57  
Met Gln Gln Lys Asn Asp Asp Gln Gln Val Lys Gln Asn Ser Pro Ser  
1 5 10 15  
Leu Ser Val Gln Glu Gly Arg Ile Ser Ile Leu Asn Cys Asp Tyr Thr  
20 25 30  
Asn Ser Met Phe Asp Tyr Phe Leu Trp Tyr Lys Lys Tyr Pro Ala Glu  
35 40 45  
Gly Pro Thr Phe Leu Ile Ser Ile Ser Ser Ile Lys Asp Lys Asn Glu  
50 55 60  
Asp Gly Arg Phe Thr Val Phe Leu Asn Lys Ser Ala Lys His Leu Ser  
65 70 75 80  
Leu His Ile Val Pro Ser Gln Pro Gly Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Ala Met Glu Gly Ala Gln Lys Leu Val Phe Gly Gln Gly Thr Arg  
100 105 110

Leu Thr Ile Asn Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln  
115 120 125

Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp  
130 135 140

Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr  
145 150 155 160

Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser  
165 170 175

Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn  
180 185 190

Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro  
195 200 205

Glu Ser Ser Pro Gly Gly Arg Ile Ala Arg Leu Glu Glu Lys Val Lys  
210 215 220

Thr Leu Lys Ala Gln Asn Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu  
225 230 235 240

Arg Glu Gln Val Ala Gln Leu Lys Gln Lys Val Met Asn Tyr  
245 250

<210> 58  
<211> 925  
<212> DNA  
<213> Umeľá sekvencia

<220>  
<223> Opis umelej sekvencie: DNA sekvencia rozpustného HLA-A2/HTLV-1 Tax  
definovaného TCR  $\beta$  reťazca z klonu M10B7/D3 fúzovaná s *c-fos*  
leucínovou zipsovou doménou a BirA biotinylačným priveskom.

<400> 58  
atgaacgctg gtgtcactca gaccccaaaa ttccaggtcc tgaagacagg acagagcatg 60  
acactgcagt gtgcccagga tatgaacat gaatacatgt cctggatcgc acaagaccca 120  
ggcatggggc tgaggctgat tcattactca gttgggtgctg gtatcactga ccaaggagaa 180  
gtccccaatg gctacaatgt ctccagatca accacagagg atttcccgct caggctgctg 240  
tcggctgctc cctcccagac atctgtgtac ttctgtgcca gcagttacca ggaggggggg 300  
ttttacgagc agtacttcgg gccgggcacc aggctcacgg tcacagagga cctgaaaaac 360  
gtgttccac ccgaggtcgc tgtgtttgag ccatcagaag cagagatctc ccacacccaa 420  
aaggccacac tgggtgcct gccacagggc ttctacccc accacgtgga gctgagctgg 480  
tgggtgaatg ggaaggaggc gcacagtggg gtcagcacag acccgcagcc cctcaaggag 540  
cagcccggcc tcaatgactc cagatacgtc ctgagcagcc gcctgagggt ctggccacc 600  
ttctggcagg acccccgcaa ccaacttcgc tgtcaagtcc agttctacgg gctctcggag 660  
aatgacgagt ggaccagga tagggcaca cccgtcacc agatcgtcag cgccgagcc 720  
tgggtagag cagacccggg gggctctgact gatactcc aagcggagac agatcaactt 780  
gaagacaaga agtctcgtt gcagaccgag attgccaatc tactgaaaga gaaggaaaaa 840  
ctagagttca tcctggcagc ttacggatcc ggtgggtggtc tgaacgatat ttttgaagct 900  
cagaaaatcg aatggcatta agctt 925

<210> 59  
 <211> 306  
 <212> PRT  
 <213> Umelá sekvencia

<220>  
 <223> Opis umelej sekvencie: Aminokyselinová sekvencia rozpustného HLA-A2/HTLV-1 Tax definovaného TCR  $\beta$  reťazca z klonu M10B7/D3 fúzovaná s *c-fos* leucínovou zipsovou doménou a BirA biotinylačným priveskom.

<400> 59  
 Met Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr  
 1 5 10 15  
 Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr  
 20 25 30  
 Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His  
 35 40 45  
 Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly  
 50 55 60  
 Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu  
 65 70 75 80  
 Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Tyr  
 85 90 95  
 Pro Gly Gly Gly Phe Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu  
 100 105 110  
 Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val  
 115 120 125  
 Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu  
 130 135 140  
 Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp  
 145 150 155 160  
 Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln  
 165 170 175  
 Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser  
 180 185 190  
 Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn His  
 195 200 205  
 Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp  
 210 215 220  
 Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala  
 225 230 235 240  
 Trp Gly Arg Ala Asp Pro Gly Gly Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala Glu  
 245 250 255

Thr Asp Gln Leu Glu Asp Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr Glu Ile Ala  
260 265 270

Asn Leu Leu Lys Glu Lys Glu Lys Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala Tyr  
275 280 285

Gly Ser Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu  
290 295 300

Trp His  
305

<210> 60  
<211> 928  
<212> DNA  
<213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Mutovaná DNA sekvencia rozpustného HLA-A2/HTLV-1 Tax definovaného TCR  $\beta$  reťazca z klonu A6 fúzovaná s *c-fos* leucínovou zipsovou doménou a BirA biotinylačným priveskom.

<220>  
<223> Opis umelej sekvencie: Mutovaná DNA sekvencia rozpustného HLA-A2/HTLV-1 Tax definovaného TCR  $\beta$  reťazca z klonu A6 fúzovaná s *c-fos* leucínovou zipsovou doménou a BirA biotinylačným priveskom.

<400> 60  
atgaacgctg gtgtcactca gacccccaaa ttccagggtcc tgaagacagg acagagcatg 60  
aactgacagt gtgccagga tatgaacat gaatacatgt cctggtatcg acaagaccca 120  
ggcatggggc tgaggctgat tcattactca gttgggtgctg gtatcactga ccaaggagaa 180  
gtccccaatg gctacaatgt ctccagatca accacagagg atttcccgt caggctgctg 240  
tcggctgctc cctcccagac atctgtgtac ttctgtgcca gcaggccggg actagcggga 300  
ggcgaccag agcagtactt cgggcccggc accaggctca cggtcacaga ggacctgaaa 360  
aacgtgttcc caccagaggt cgctgtgttt gagccatcag aagcagagat ctcccacacc 420  
caaaaggcca cactggtgtg cctggccaca ggcttctacc cggaccacgt ggagctgagc 480  
tgggtgggtga atgggaagga ggtgcacagt ggggtcagca cagaccgca gccctcaag 540  
gagcagcccg ccctcaatga ctccagatac gctctgagca gccgcctgag ggtctcggcc 600  
accttctggc aggacccccg caaccacttc cgctgtcaag tccagttcta cgggctctcg 660  
gagaatgacg agtggaccca ggatagggcc aaacctgtca cccagatcgt cagcgccgag 720  
gcctggggta gagcagaccc cgggggtctg actgatacac tccaagcgga gacagatcaa 780  
cttgaagaca agaagtctgc gttgcagacc gagattgcca atctactgaa agagaaggaa 840  
aaactagagt tcatcctggc agcttacgga tccgggtggtg gtctgaacga tatttttgaa 900  
gctcagaaaa tcgaatggca ttaagctt 928

<210> 61  
<211> 307  
<212> PRT  
<213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Aminokyselinová sekvencia mutovaného rozpustného HLA-A2/HTLV-1 Tax definovaného TCR  $\beta$  reťazca z klonu A6 fúzovaná s *c-fos* leucínovou zipsovou doménou a BirA biotinylačným priveskom.

<220>  
<223> Opis umelej sekvencie: Aminokyselinová sekvencia mutovaného rozpustného HLA-A2/HTLV-1 Tax definovaného TCR  $\beta$  reťazca z klonu A6

fúzovaná s *c-fos* leucínovou zipsovou doménou a BirA biotinylačným príveskom.

<400> 61

```

Met Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr
 1                               10                      15

Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr
                20                      25                      30

Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His
                35                      40                      45

Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly
                50                      55                      60

Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu
 65                      70                      75                      80

Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Pro
                85                      90                      95

Gly Leu Ala Gly Gly Arg Pro Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg
                100                     105                     110

Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala
 115                     120                     125

Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr
 130                     135                     140

Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser
 145                     150                     155                     160

Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro
                165                     170                     175

Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu
                180                     185                     190

Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn
 195                     200                     205

His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu
 210                     215                     220

Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu
 225                     230                     235                     240

Ala Trp Gly Arg Ala Asp Pro Gly Gly Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala
                245                     250                     255

Glu Thr Asp Gln Leu Glu Asp Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr Glu Ile
 260                     265                     270

Ala Asn Leu Leu Lys Glu Lys Glu Lys Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala
 275                     280                     285

Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile
 290                     295                     300

```

**Glu Trp His**  
305

<210> 62  
<211> 190  
<212> DNA  
<213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> DNA sekvencia *c-fos*-BirA biotinylačného príveskového partnera na fúziu používaného pre TCR  $\beta$  reťazce.

<220>  
<223> Opis umelej sekvencie: DNA sekvencia *c-fos*-BirA biotinylačného príveskového partnera na fúziu používaného pre TCR  $\beta$  reťazce.

<400> 62  
ccccgggggtc tgactgatac actccaagcg gagacagatc aacttgaaga caagaagtct 60  
gcgttgacaga cgcagattgc caatctactg aaagagaagg aaaactaga gttcatcctg 120  
gcagcttacg gatccgggtg tggcttgaac gatatttttg aagctcagaa aatcgaatgg 180  
cattaagctt 190

<210> 63  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Opis umelej sekvencie: Aminokyselinová sekvencia *c-fos*-BirA biotinylačného príveskového partnera na fúziu používaného pre TCR  $\beta$  reťazce.

<400> 63  
Pro Gly Gly Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala Glu Thr Asp Gln Leu Glu  
1 5 10 15  
Asp Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr Glu Ile Ala Asn Leu Leu Lys Glu  
20 25 30  
Lys Glu Lys Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala Tyr Gly Ser Gly Gly Gly  
35 40 45  
Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His  
50 55 60

<210> 64  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Reverzný primer používaný na PCR amplifikáciu  $v\text{-}\beta\text{-c-fos}$  leucínového zipsového fragmentu fúzovaného génu ľudského JM22 TCR, ktorý je definovaný Influenza matricovým peptidom prezentovaným na HLA-A0201.

<220>  
<223> Opis umelej sekvencie: Reverzný primer používaný na PCR amplifikáciu  $v\text{-}\beta\text{-c-fos}$  leucínového zipsového fragmentu fúzovaného génu ľudského

JM22 TCR, ktorý je definovaný Influenza matricovým peptidom prezentovaným na HLA-A0201.

<400> 64

acacacggat ccgtaagctg cgacgatgaa ctcgattttc tt

42

<210> 65

<211> 744

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: Gén kódujúci ľudský JM22 TCR  $\alpha$  reťazec, ktorý je definovaný HLA-A2/flu matricovým peptidom, fúzovaný s *c-jun* leucínovou zipsovou doménou.

<400> 65

```
atgcaactac tagaacaag tcctcagttt ctaagcatcc aagagggaga aaatctcact 60
gtgtactgca actcctcaag tgtttttcc agcttacaat ggtacagaca ggagcctggg 120
gaaggtcctg tcctcctggt gacagtagtt acgggtggag aagtgaagaa gctgaagaga 180
ctaacctttc agtttggtga tgcaagaaag gacagttctc tccacatcac tgggcccag 240
cctggtgata caggcctcta cctctgtgca ggagcgggaa gccaaaggaa tctcatcttt 300
ggaaaaggca ctaaactctc tgttaaacca aatatccaga accctgacct tgcctgttac 360
cagctgagag actctaaatc cagtgacaag tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct 420
caaacaaatg tgtcacaag taaggattct gatgtgtata tcacagacaa aactgtgcta 480
gacatgaggt ctatggactt caagagcaac agtgctgtgg cctggagcaa caaatctgac 540
tttgcattgt caaacgcctt caacaacagc attattccag aagacacctt cttccccagc 600
ccagaaagtt cccccggggg tagaatcgcc cggctggagg aaaaagtgaa aaccttgaaa 660
gctcagaact cggagctggc gtcacggcc aacatgctca gggaacaggt ggcacagctt 720
aaacagaaag tcatgaacta cttag 744
```

<210> 66

<211> 247

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: Aminokyselinová sekvencia ľudského JM22 TCR  $\alpha$  reťazca, ktorý je definovaný HLA-A2/flu matricovým peptidom, fúzovaného s *c-jun* leucínovou zipsovou doménou.

<400> 66

```
Met Gln Leu Leu Glu Gln Ser Pro Gln Phe Leu Ser Ile Gln Glu Gly
  1                5                10                15

Glu Asn Leu Thr Val Tyr Cys Asn Ser Ser Ser Val Phe Ser Ser Leu
  20                25                30

Gln Trp Tyr Arg Gln Glu Pro Gly Glu Gly Pro Val Leu Leu Val Thr
  35                40                45

Val Val Thr Gly Gly Glu Val Lys Lys Leu Lys Arg Leu Thr Phe Gln
  50                55                60

Phe Gly Asp Ala Arg Lys Asp Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ala Gln
  65                70                75                80
```

Pro Gly Asp Thr Gly Leu Tyr Leu Cys Ala Gly Ala Gly Ser Gln Gly  
85 90 95

Asn Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Lys Pro Asn Ile  
100 105 110

Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser  
115 120 125

Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val  
130 135 140

Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu  
145 150 155 160

Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser  
165 170 175

Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile  
180 185 190

Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Pro Gly Gly Arg  
195 200 205

Ile Ala Arg Leu Glu Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala Gln Asn Ser  
210 215 220

Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln Leu  
225 230 235 240

Lys Gln Lys Val Met Asn Tyr  
245

<210> 67  
<211> 864  
<212> DNA  
<213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Opis umelej sekvencie: Gén kódujúci ľudský JM22 TCR  $\beta$  reťazec, ktorý je definovaný HLA-A2/flu matricovým peptidom, fúzovaný s *c-fos* leucínovou zipsovou doménou.

<400> 67  
atggtggatg gtggaatcac tcagtcccca aagtacctgt tcagaaagga aggacagaat 60  
gtgaccctga gttgtgaaca gaatttgaac cacgatgcca tgtactggta ccgacaggac 120  
ccagggcaag ggctgagatt gatctactac tcacagatag taaatgactt tcagaaagga 180  
gatatagctg aagggtacag cgtctctcgg gagaagaagg aatcctttcc tctcactgtg 240  
acatcggccc aaaagaacct gacagctttc tatctctgtg ccagtagttc gaggagctcc 300  
tacgagcagt acttcgggcc gggcaccagg ctcacggtca cagaggacct gaaaaacggt 360  
ttcccacccg aggtcgctgt gtttgaacca tcagaagcag agatctccca cacccaaaag 420  
gccacactgg tgtgcctggc cacaggcttc taccgacc acgtggagct gagctggtgg 480  
gtgaatggga aggaggtgca cagtggggtc agcacagacc cgcagcccct caaggagcag 540  
cccgcctca atgactccag atactgctg agcagccgct tgaggggtctc ggccacctc 600  
tggcagaacc cccgcaacca ctccgctgt caagtccagt tctacgggct ctcgagaaat 660  
gacgagtgga cccaggatag ggccaaacct gtcaccaga tcgtcagcgc cgaggcctgg 720  
ggtagagcag accccggggg tctgactgat aactccaag cggagacaga tcaactttaa 780  
gacaagaagt ctgctgtgca gaccgagatt gccaatctac tgaaagagaa ggaaaaacta 840  
gagttcatcc tggcagctta ctgag 864

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 287

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umelá sekvencia

&lt;220&gt;

<223> Opis umelej sekvencie: Aminokyselinová sekvencia ľudského JM22 TCR  $\beta$  reťazca, ktorý je definovaný HLA-A2/flu matricovým peptidom, fúzovaná s *c-fos* leucínovou zipsovou doménou.

&lt;400&gt; 68

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

Asp Gln Leu Glu Asp Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr Glu Ile Ala Asn  
 260 265 270

Leu Leu Lys Glu Lys Glu Lys Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala Tyr  
 275 280 285

- <210> 69
- <211> 918
- <212> DNA
- <213> Umelá sekvencia

<220>  
 <223> Opis umelej sekvencie: Gén kódujúci ľudský JM22 TCR β reťazec, ktorý je definovaný HLA-A2/flu matricovým peptidom, fúzovaný s *c-fos* leucínovou zipsovou doménou a BirA biotinylačným priveskom.

<400> 69  
 atggtggatg gtggaatcac tcagtcccca aagtacctgt tcagaaagga aggacagaat 60  
 gtgaccctga gttgtgaaca gaatttgaac cacgatgcca tgtactggta cgcacaggac 120  
 ccagggcaag ggctgagatt gatctactac tcacagatag taaatgactt tcagaaagga 180  
 gatatagctg aagggtacag cgtctctcgg gagaagaagg aatcctttcc tctcactgtg 240  
 acatcgccc aaaagaacce gacagctttc tatctctgtg ccagtagttc gaggagctcc 300  
 tacgagcagt acttcggggc gggcaccagg ctcacgggtca cagaggacct gaaaaacggt 360  
 ttcccacccg aggtcgtgtg gtttgaacca tcagaagcag agatctccca cacccaaaag 420  
 gccacactgg tgtgcctggc cacaggcttc taccctgacc acgtggagct gagctgggtg 480  
 gtgaatggga aggaggtgca cagtggggtc agcacagacc cgcagcccct caaggagcag 540  
 cccgccctca atgactccag atactgcctg agcagccgcc tgaggggtctc ggccaccttc 600  
 tggcagaacc cccgcaacca cttccgctgt caagtccagt tctacgggct ctcggagaat 660  
 gacgagtgga cccaggatag ggccaaacct gtcaccaga tcgtcagcgc cgaggcctgg 720  
 ggtagagcag accccggggg tctgactgat aactccaag cggagacaga tcaactttaa 780  
 gacaagaagt ctgcgttgca gaccgagatt gccaatctac tgaagagaa ggaaaaacta 840  
 gagttcatcc tggcagctta cggatccggt ggtggtctga acgatatttt tgaagctcag 900  
 aaaatcgaat ggcattaa 918

- <210> 70
- <211> 305
- <212> PRT
- <213> Umelá sekvencia

<220>  
 <223> Opis umelej sekvencie: Aminokyselinová sekvencia ľudského JM22 TCR β reťazca, ktorý je definovaný HLA-A2/flu matricovým peptidom, fúzovaná s *c-fos* leucínovou zipsovou doménou a BirA biotinylačným priveskom.

<400> 70  
 Met Val Asp Gly Gly Ile Thr Gln Ser Pro Lys Tyr Leu Phe Arg Lys  
 1 5 10 15  
 Glu Gly Gln Asn Val Thr Leu Ser Cys Glu Gln Asn Leu Asn His Asp  
 20 25 30  
 Ala Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Ser Gln Ile Val Asn Asp Phe Gln Lys Gly Asp Ile Ala Glu  
 50 55 60



- 97 -

Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Ser Phe Pro Leu Thr Val  
65 70 75 80

Thr Ser Ala Gln Lys Asn Pro Thr Ala Phe Tyr Leu Cys Ala Ser Ser  
85 90 95

Ser Arg Ser Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr  
100 105 110

Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe  
115 120 125

Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val  
130 135 140

Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp  
145 150 155 160

Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro  
165 170 175

Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser  
180 185 190

Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe  
195 200 205

Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr  
210 215 220

Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp  
225 230 235 240

Gly Arg Ala Asp Pro Gly Gly Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala Glu Thr  
245 250 255

Asp Gln Leu Glu Asp Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr Glu Ile Ala Asn  
260 265 270

Leu Leu Lys Glu Lys Glu Lys Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala Tyr Gly  
275 280 285

Ser Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp  
290 295 300

His  
305

<210> 71

<211> 750

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: Gén kódujúci ľudský HLA-A2/HTLV-1 Tax  
peptidom definovaný TCR  $\alpha$  reťazec z klonu A6 fúzovaný s *c-jun*  
leucínovou zipsovou doménou.

<400> 71

```

atgcagaagg aagtggagca gaactctgga cccctcagtg ttccagaggg agccattgcc 60
tctctcaact gcacttacag tgaccgaggt tcccagtcct tcttctggta cagacaatat 120
tctgggaaaa gccctgagtt gataatgtcc atatactcca atggtgacaa agaagatgga 180
aggtttacag cacagctcaa taaagccagc cagtatgttt ctctgctcat cagagactcc 240
cagcccagtg attcagccac ctacctctgt gccgttacia ctgacagctg ggggaaattg 300
cagtttgagg cagggaccca ggttgtggtc accccagata tccagaacct tgaccctgcc 360
gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg tctgcctatt caccgatttt 420
gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg tgtatatcac agacaaaact 480
gtgctagaca tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaaa 540
tctgactttg catgtgcaaa cgccttcaac aacagcatta ttccagaaga caccttcttc 600
cccagcccag aaagttcccc cgggggtaga atcgcccggc tggaggaaaa agtgaaaacc 660
ttgaaagctc agaactcgga gctggcgtcc acggccaaca tgctcaggga acaggtggca 720
cagcttaaac agaaagtcac gaactactag                                750

```

<210> 72  
 <211> 249  
 <212> PRT  
 <213> Umelá sekvencia

<22C>  
 <223> Opis umelej sekvencie: Aminokyselinová sekvencia ľudského HLA-A2/HTLV-1 Tax peptidom definovaného TCR  $\alpha$  reťazca z klonu A6 fúzovaná s *c-jun* leucínovou zipsovou doménou.

<400> 72

Met	Gln	Lys	Glu	Val	Glu	Gln	Asn	Ser	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Pro	Glu
1				5					10					15	
Gly	Ala	Ile	Ala	Ser	Leu	Asn	Cys	Thr	Tyr	Ser	Asp	Arg	Gly	Ser	Gln
			20					25					30		
Ser	Phe	Phe	Trp	Tyr	Arg	Gln	Tyr	Ser	Gly	Lys	Ser	Pro	Glu	Leu	Ile
		35					40					45			
Met	Ser	Ile	Tyr	Ser	Asn	Gly	Asp	Lys	Glu	Asp	Gly	Arg	Phe	Thr	Ala
	50					55					60				
Gln	Leu	Asn	Lys	Ala	Ser	Gln	Tyr	Val	Ser	Leu	Leu	Ile	Arg	Asp	Ser
65					70					75					80
Gln	Pro	Ser	Asp	Ser	Ala	Thr	Tyr	Leu	Cys	Ala	Val	Thr	Thr	Asp	Ser
				85					90						95
Trp	Gly	Lys	Leu	Gln	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Gln	Val	Val	Val	Thr	Pro
		100						105						110	
Asp	Ile	Gln	Asn	Pro	Asp	Pro	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu	Arg	Asp	Ser	Lys
		115					120					125			
Ser	Ser	Asp	Lys	Ser	Val	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln	Thr
	130					135					140				
Asn	Val	Ser	Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys	Thr
145					150					155					160
Val	Leu	Asp	Met	Arg	Ser	Met	Asp	Phe	Lys	Ser	Asn	Ser	Ala	Val	Ala
				165					170						175



- 99 -

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser  
180 185 190

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Pro Gly  
195 200 205

Gly Arg Ile Ala Arg Leu Glu Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala Gln  
210 215 220

Asn Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala  
225 230 235 240

Gln Leu Lys Gln Lys Val Met Asn Tyr  
245

<210> 73  
<211> 928  
<212> DNA  
<213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Opis umelej sekvencie: Gén kódujúci ľudský HLA-A2/HTLV-1 Tax peptidom definovaný TCR  $\beta$  reťazec z klonu A6 fúzovaný s *c-fos* leucínovou zipsovou doménou a BirA biotinylačným príveskom.

<400> 73  
atgaacgctg gtgtcactca gacccccaaa ttccagggtcc tgaagacagg acagagcatg 60  
acactgcagt gtgcccagga tatgaacctat gaatacatgt cctgggtatcg acaagaccca 120  
ggcatggggc tgaggctgat tcattactca gttgggtgctg gtatcactga ccaaggagaa 180  
gtccccaatg gctacaatgt ctccagatca accacagagg atttcccgct caggctgctg 240  
tcggctgctc cctcccagac atctgtgtac ttctgtgcca gcaggccggg actagcggga 300  
gggcgaccag agcagtaactt cgggcccggc accaggctca cggtcacaga ggacctgaaa 360  
aacgtgttcc caccggaggc cgctgtgttt gagccatcag aagcagagat ctcccacacc 420  
caaaaggcca cactgggtgtg cctggccaca ggcttctacc cggaccacgt ggagotgagc 480  
tggtgggtga atgggaagga ggtgcacagt ggggtcagca cagaccgca gccctcaag 540  
gagcagcccg ccctcaatga ctccagatac gctctgagca gccgcctgag ggtctcggcc 600  
accttctggc agaacccccg caaccacttc cgctgtcaag tccagttcta cgggctctcg 660  
gagaatgacg agtggaccca ggatagggcc aaacctgtca cccagatcgt cagcgcagg 720  
gcctggggta gagcagaccc cgggggtctg actgatacac tccaagcggg gacagatcaa 780  
cttgaagaca agaagtctgc gttgcagacc gagattgcca atctactgaa agagaaggaa 840  
aaactagagt tcatcctggc agcttacgga tccgggtggtg gtctgaacga tatttttgaa 900  
gctcagaaaa tcgaatggca ttaagctt 928

<210> 74  
<211> 307  
<212> PRT  
<213> Umelá sekvencia

<220>  
<223> Opis umelej sekvencie: Aminokyselinová sekvencia ľudského HLA-A2/HTLV-1 Tax peptidom definovaného TCR  $\beta$  reťazca z klonu A6 fúzovaná s *c-fos* leucínovou zipsovou doménou a BirA biotinylačným príveskom.

<400> 74  
Met Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr  
1 5 10 15



- 100 -

Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr  
20 25 30

Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His  
35 40 45

Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly  
50 55 60

Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu  
65 70 75 80

Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Pro  
85 90 95

Gly Leu Ala Gly Gly Arg Pro Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg  
100 105 110

Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala  
115 120 125

Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr  
130 135 140

Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser  
145 150 155 160

Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro  
165 170 175

Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu  
180 185 190

Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn  
195 200 205

His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu  
210 215 220

Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu  
225 230 235 240

Ala Trp Gly Arg Ala Asp Pro Gly Gly Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala  
245 250 255

Glu Thr Asp Gln Leu Glu Asp Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr Glu Ile  
260 265 270

Ala Asn Leu Leu Lys Glu Lys Glu Lys Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala  
275 280 285

Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile  
290 295 300

Glu Trp His  
305

<210> 75

<211> 765



<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: Gén kódujúci ľudský HLA-A2/HTLV-1 Tax peptidom definovaný TCR  $\alpha$  reťazec z klonu M10B7/D3 fúzovaný s *c-jun* leucínovou zipsovou doménou.

<400> 75

```
atgcaacaga agaatgatga ccagcaagtt aagcaaaatt caccatccct gagcgtccag 60
gaaggaagaa tttctattct gaactgtgac tataactaaca gcatgtttga ttatttcccta 120
tggtaaaaa aataccctgc tgaaggctct acattcctga tatctataag ttccattaag 180
gataaaaatg aagatggaag attcactgtc ttcttaaaca aaagtgcaa gcacctctct 240
ctgcacattg tgccctccca gcctggagac tctgcagtgt acttctgtgc agcaatggag 300
ggagcccaga agctggtatt tggccaagga accaggctga ctatcaacc aaatatccag 360
aacctgacc ctgccgtgta ccagctgaga gactctaaat ccagtgacaa gtctgtctgc 420
ctattcaccg attttgattc tcaaacaaat gtgtcacaaa gtaaggattc tgatgtgtat 480
atcacagaca aaactgtgct agacatgagg tctatggact tcaagagcaa cagtgtctgtg 540
gcctggagca acaaactctga ctttgcattg gcaaacgcct tcaacaacag cattattcca 600
gaagacacct tcttccccag cccagaaagt tccccgggg gtagaatcgc cgggctggag 660
gaaaaagtga aaaccttgaa agctcagaac tcggagctgg cgtccacggc caacatgctc 720
agggaacagg tggcacagct taaacagaaa gtcatgaact actag 765
```

<210> 76

<211> 254

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: Aminokyselinová sekvencia ľudského HLA-A2/HTLV-1 Tax peptidom definovaného TCR  $\alpha$  reťazca z klonu M10B7/D3 fúzovaná s *c-jun* leucínovou zipsovou doménou.

<400> 76

```
Met Gln Gln Lys Asn Asp Asp Gln Gln Val Lys Gln Asn Ser Pro Ser
 1                    5                10                15

Leu Ser Val Gln Glu Gly Arg Ile Ser Ile Leu Asn Cys Asp Tyr Thr
                20                25                30

Asn Ser Met Phe Asp Tyr Phe Leu Trp Tyr Lys Lys Tyr Pro Ala Glu
 35                    40                45

Gly Pro Thr Phe Leu Ile Ser Ile Ser Ser Ile Lys Asp Lys Asn Glu
 50                    55                60

Asp Gly Arg Phe Thr Val Phe Leu Asn Lys Ser Ala Lys His Leu Ser
 65                    70                75                80

Leu His Ile Val Pro Ser Gln Pro Gly Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
                85                90                95

Ala Ala Met Glu Gly Ala Gln Lys Leu Val Phe Gly Gln Gly Thr Arg
 100                    105                110

Leu Thr Ile Asn Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln
 115                    120                125

Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp
```

130		135		140
Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr				
145		150		155
Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser				
		165		170
Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn				
		180		185
Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro				
		195		200
Glu Ser Ser Pro Gly Gly Arg Ile Ala Arg Leu Glu Glu Lys Val Lys				
		210		215
Thr Leu Lys Ala Gln Asn Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu				
		225		230
Arg Glu Gln Val Ala Gln Leu Lys Gln Lys Val Met Asn Tyr				
		245		250

<210> 77  
 <211> 925  
 <212> DNA  
 <213> Umelá sekvencia

<220>  
 <223> Opis umelej sekvencie: Gén kódujúci ľudský HLA-A2/HTLV-1 Tax peptidom definovaný TCR  $\beta$  reťazec z klonu M10B7/D3 fúzovaný s *c-fos* leucínovou zipsovou doménou a BirA biotinylačným priveskom.

<400> 77  
 atgaacgctg gtgtcactca gacccccaaa ttccaggtcc tgaagacagg acagagcatg 60  
 aactgacagt gtgcccagga tatgaaccat gaatacatgt cctggatcgc acaagaccca 120  
 ggcattggggc tgaggctgat tcattactca gttggtgctg gtatcactga ccaaggagaa 180  
 gtccccaatg gctacaatgt ctccagatca accacagagg atttcccgcg caggctgctg 240  
 tcggctgctc cctcccagac atctgtgtac ttctgtgcca gcagttacca ggaggggggg 300  
 ttttacgagc agtacttcgg gccgggcacc aggtcacagg tcacagagga cctgaaaaac 360  
 gtgttcccac ccgaggctgc tgtgtttgag ccatcagaag cagagatctc ccacacccaa 420  
 aaggccacac tgggtgtgct gccacagggc ttctaccccg accacgtgga gctgagctgg 480  
 tgggtgaatg ggaaggaggt gcacagtggg gtcagcacag acccgcagcc cctcaaggag 540  
 cagcccgcgc tcaatgactc cagatacgtc ctgagcagcc gcctgagggt ctggccacc 600  
 ttctggcagg acccccgcaa ccacttccgc tgtcaagtcc agttctacgg gctctcggag 660  
 aatgacgagt ggaccagga tagggccaaa cccgtcacc agatcgtcag cgccgaggcc 720  
 tggggtagag cagaccccgg gggctctgact gatacactcc aagcggagac agatcaactt 780  
 gaagacaaga agtctgcgct gcagaccgag attgccaatc tactgaaaga gaaggaaaaa 840  
 ctagagttca tcctggcagc ttacggatcc ggtggtggtc tgaacgatat ttttgaagct 900  
 cagaaaatcg aatggcatta agctt 925

<210> 78  
 <211> 306  
 <212> PRT  
 <213> Influenza vírus

<400> 78  
 Met Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr  
 1 5 10 15



Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr  
20 25 30

Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His  
35 40 45

Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly  
50 55 60

Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu  
65 70 75 80

Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Tyr  
85 90 95

Pro Gly Gly Gly Phe Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu  
100 105 110

Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val  
115 120 125

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu  
130 135 140

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp  
145 150 155 160

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln  
165 170 175

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser  
180 185 190

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn His  
195 200 205

Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp  
210 215 220

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala  
225 230 235 240

Trp Gly Arg Ala Asp Pro Gly Gly Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala Glu  
245 250 255

Thr Asp Gln Leu Glu Asp Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr Glu Ile Ala  
260 265 270

Asn Leu Leu Lys Glu Lys Glu Lys Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala Tyr  
275 280 285

Gly Ser Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu  
290 295 300

Trp His  
305

<210> 79  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Influenza vírus

<220>  
<223> Peptid odvodený od Influenza vírusového matricového proteínu a prezentovaný ako peptidový antigén prostredníctvom HLA-A0201. Táto HLA/peptidová kombinácia definuje JM22 TCR.

<400> 79  
**Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu**  
1 5

<210> 80  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Virus ľudskej imunodeficiencie typu 1

<220>  
<223> Peptid odvodený od HIV-1 Gag proteínu a prezentovaný ako peptidový antigén prostredníctvom HLA-A0201. Táto HLA/peptidová kombinácia definuje klonovaný TCR od pacienta 003.

<400> 80  
**Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu**  
1 5

<210> 81  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Influenza vírus

<220>  
<223> Peptid odvodený od Influenza vírusového nukleoproteínu a prezentovaný ako peptidový antigén prostredníctvom hľodavčieho H2-Db. Táto HLA/peptidová kombinácia definuje hľodavčí F5 TCR.

<400> 81  
**Ala Ser Asn Glu Asn Met Asp Ala Met**  
1 5

<210> 82  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Ľudský T-bunkový lymfotropický vírus typu 1

<220>  
<223> Peptid odvodený od HTLV-1 Tax proteínu a prezentovaný ako peptidový antigén prostredníctvom HLA-A0201. Táto HLA/peptidová kombinácia definuje A6 a B7 TCRs.

<400> 82  
**Leu Leu Phe Gly Tyr Pro Val Tyr Val**  
1 5

<210> 83  
<211> 9

<212> PRT

<213> Virus ľudskej imunodeficiencie

<220>

<223> Peptid odvodený od HIV-1 Pol proteínu a prezentovaný ako peptidový antigén prostredníctvom HLA-A0201.

<400> 83

Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val

1

5

<210> 84

<211> 37

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: Primer na PCR amplifikáciu ľudského V $\beta$ 17 reťazca fúzovaného s BirA biotinylačným priveskom.

<400> 84

**gctctagaca tatgggccca gtggattctg gagtcac**

37

<210> 85

<211> 90

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: Primer na PCR amplifikáciu ľudského V $\beta$ 17 reťazca fúzovaného s BirA biotinylačným priveskom.

<400> 85

**gggggaagct taatgccatt cgattttctg agcttcaaaa atatcgttca gaccaccacc 60**

**ggatccgtaa gctgccagga tgaactctag**

90

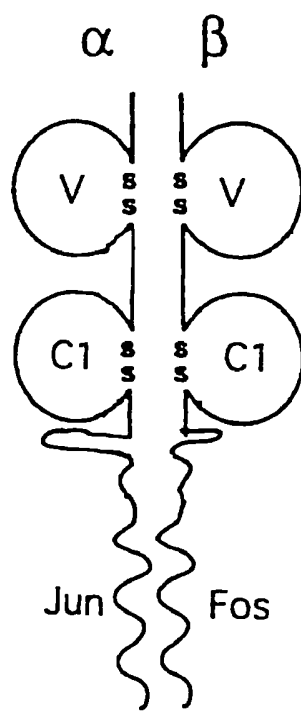
## Literatúra

- Aifantis, I., O. Azogui, a další (1998). *Immunity* 9(5): 649-55.
- Altamirano, M. M., C. Garcia, a další (1999). *Nature Biotechnology* 17: 187-191.
- Altamirano, M. M., R. Golbik, a další (1997). *Proc Natl Acad Sci USA* 94(8): 3576-8.
- Amati, B., S. Dalton, a další (1992). *Nature* 359(6394): 423-6
- Barker, D. F. a A. M. Campbell (1981). *J. Mol Biol* 146(4): 469-92
- Barker, D. F. a Campbell, A. M. (1981). *J. Mol Biol* 146: 469-92
- Bentley, G. A., G. Boulot, a další (1995). *Science* 267(5206): 1984-7 Issn:0036-8075)
- Bjorkman, P. J., J. L. Strominger, a další (1985). *J. Mol. Biol* 186(1): 205-10 Issn: 0022-2836
- Boice, J. A., G. R. Dieckmann, a další (1996). *Biochemistry* 35(46): 14480-5
- Boulot, G., G. A. Bentley, a další (1994). *J. Mol Biol* 235(2): 795-7 Issn: 0022-2836
- Brocker, T., A. Peter, a další (1993). *Eur J Immunol* 23(7): 1435-9 Issn: 0014-2980
- Buday, L. a J. Downward (1993). *Cell* 73(3): 611-20
- Calaman, S. D., G. R. Carson, a další (1993). *J Immunol Methods* 164(2): 233-44  
Issn: 0022-1759
- Chao, H., M. E. Houston, Jr. , a další (1996). *Biochemistry* 35(37): 12175-85
- Chang, H. C., Z. Bao, a další (1994). *Proc Natl Acad Sci USA* 91(24): 11408-12
- Chevray, P. M. a D. Nathans (1992). *Proc Natl Acad Sci USA* 89(13): 5789-93
- Chicz, R. M., R. G. Urban, a další (1993). *J Exp Med* 178(1): 27-47
- Corr, M., A. E. Slanetz, a další (1994). *Science* 265(5174): 946-9
- Davis, M. M., J. J. Boniface, a další (1998). *Annu. Rev. Immunol.* 16: 524-544
- de Kruif, J. a T. Logtenberg (1996). *J Biol Chem* 271(13): 7630-4
- Ding, Y. H., K. J. Smith, a další (1998). *Immunity* 8(4): 403-11
- Eilat, D., G. E. Kikuchi, a další (1992). *Proc Natl Acad Sci USA* 89(15): 6871-5  
Issn:0027-8424
- Engelhard, V. H. (1994). *Annu Rev Immunol* 12: 181-207
- Engelhard, V. H., E. Appella, a další (1993). *Chem Immunol* 57: 39-62

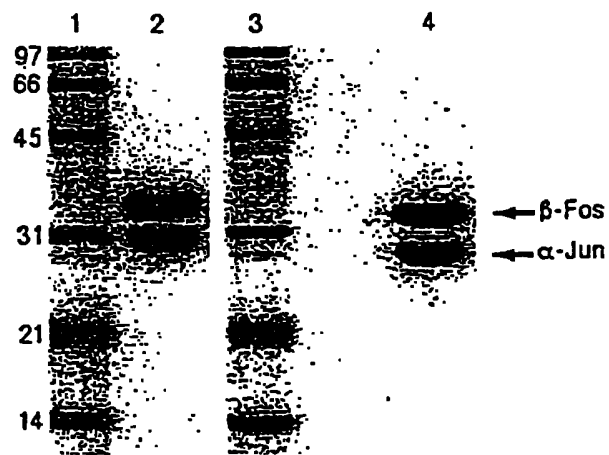
- Fields, B. A., E. L. Malchiodi, a další (1996). *Nature* 384(6605): 188-92 Issn: 0028-0836
- Gao, G. F., U. C. Gerth, a další (1998). *Prot. Sci.* 7: 1245-49
- Gao, G. F., J. Tormo, a další (1997). *Nature* 387(6633): 630-4
- Garboczi, D. N. a W. E. Biddison (1999). *Immunity* 10(1): 1-7
- Garboczi, D. N., P. Ghosh, a další (1996). *Nature* 384(6605): 134-41
- Garboczi, D. N., D. T. Hung, a další (1992). *Proc Natl Acad Sci USA* 89(8): 3429-33  
Issn: 0027-8424
- Garboczi, D. N., D. R. Madden, a další (1994). *J. Mol Biol* 239(4): 581-7 Issn: 0022-2836
- Garboczi, D. N., U. Utz, a další (1996). *J Immunol* 157(12): 5403-10
- Garcia, K. C., M. Degano, a další (1996). *Science* 274(5285): 209-19 Issn: 0036-8075
- Garcia, K. C., C. A. Scott, a další (1996). *Nature* 384(6609): 577-81 Issn: 0028-0836
- Glover, J. N. a S. C. Harrison (1995). *Nature* 373(6511): 257-61
- Golden, A., S. S. Khandekar, a další (1997). *J Immunol Methods* 206(1-2): 163-9
- Greenfield, N. J., G. T. Montelieno, a další (1998). *Biochemistry* 37(21): 7834-43
- Gregoire, C., B. Malissen, a další (1996). *Eur J Immunol* 26(10): 2410-6 Issn: 0014-2980
- Gregoire, C., N. Reba, a další (1991). *Proc Natl Acad Sci USA* 88(18): 8077-81  
Issn: 0027-8424
- Hilyard, a další (1994) *Proc Natl Acad Sci* 91: 9057-9061
- Howard, P. K., J. Shaw, a další (1993). *Gene* 35(3): 321-31
- Hu, J. C., N. E. Newell, a další (1993). *Protein Sci* 2(7): 1072-84
- Huczko, E. L., W. M. Bodnar, a další (1993). *J Immunol* 151(5): 2572-87
- Hunt, D. F., H. Michel, a další (1992). *Science* 256(5065): 1817-20 Issn: 0036-8075
- Ishii, Y., T. Nakano, a další (1995). *J Immunol Methods* 186(1): 27-36 Issn: 0022-1759
- Kouzarides, T. A E. Ziff (1989). *Nature* 340(6234): 568-71
- Landschulz, W. H., P. F. Johnson, a další (1988). *Science* 240(4860): 1759-64

- Lowenstein, E. J., R. J. Daly, a ďalší (1992). *Cell* 70(3): 431-42
- Lumb, K. J. a P. S. Kim (1995). *Biochemistry* 34(27): 8642-6
- Madden, D. R., D. N. Garboczi, a ďalší (1993). (publikované opravy chýb sa nachádzajú v *Cell* z 28.1.1994; 76(2) od str. 410). *Cell* 75(4): 693-708 Issn: 0092-8674
- Matsui, K., J. J. Boniface, a ďalší (1994). *Proc Natl Acad Sci USA* 91(26): 12862-6  
Issn: 0027-8424
- McKnight, S. L. (1991). *Sci Am* 264(4):54-64
- Moss, a ďalší (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8987-8990 Issn: 0027-8424
- Nautiyal, S., D. N. Woolfson, a ďalší (1995). *Biochemistry* 34(37): 11645-51
- Necker, A., N. Rebai, a ďalší (1991). *Eur J Immunol* 21(12): 3035-40 Issn: 0014-2980
- O'Callaghan, C. A., M. F. Byford, a ďalší (1999). *Anal Biochem* 266(1): 9-15
- O'Shea, E. K., R. Rutkowski, a ďalší (1992). *Cell* 68(4): 699-708
- O'Shea, E. K., R. Rutkowski, a ďalší (1989). *Science* 245(4918): 646-8
- O'Shea, E. K., Lumb, K. J. a Kim, P. S. (1993) *Curr. Biol.* 3: 658-667
- Plaksin, D., K. Polakova, a ďalší (1997). *J Immunol* 158(5): 2218-27
- Rabinowitz, J. D., C. Beeson, a ďalší (1996). *Proc Natl Acad Sci USA* 93(4): 1401-5  
Issn: 0027-8424
- Ramiro, A. R., C. Trigueros, a ďalší (1996). *J Exp Med* 184(2): 519-30 Issn: 0022-1007
- Reid, S. W., S. McAdam, a ďalší (1996). *J Exp Med* 184(6): 2279-86
- Reid, S. W., K. J. Smith, a ďalší (1996). *FEBS Lett* 383(1-2): 119-23
- Riley, L. G., G. B. Ralston, a ďalší (1996). (publikovaná oprava chýb sa nachádza v *Protein Eng* 1996 Sep, 9(9): 831). *Protein Eng* 9(2): 223-30
- Romagne, F., M. A. Peyrat, a ďalší (1996). *J Immunol Methods* 189(1): 25-36 Issn: 0022-1759
- Saint Ruf, C., K. Ungewiss, a ďalší (1994). *Science* 266(5188): 1208-12 Issn: 0036-8075
- Schatz, P. J. (1993). *Biotechnology N Y* 11(10): 1138-43
- Schlessinger, J. (1994) *Curr Opin Genet Dev* 4(1): 25-30

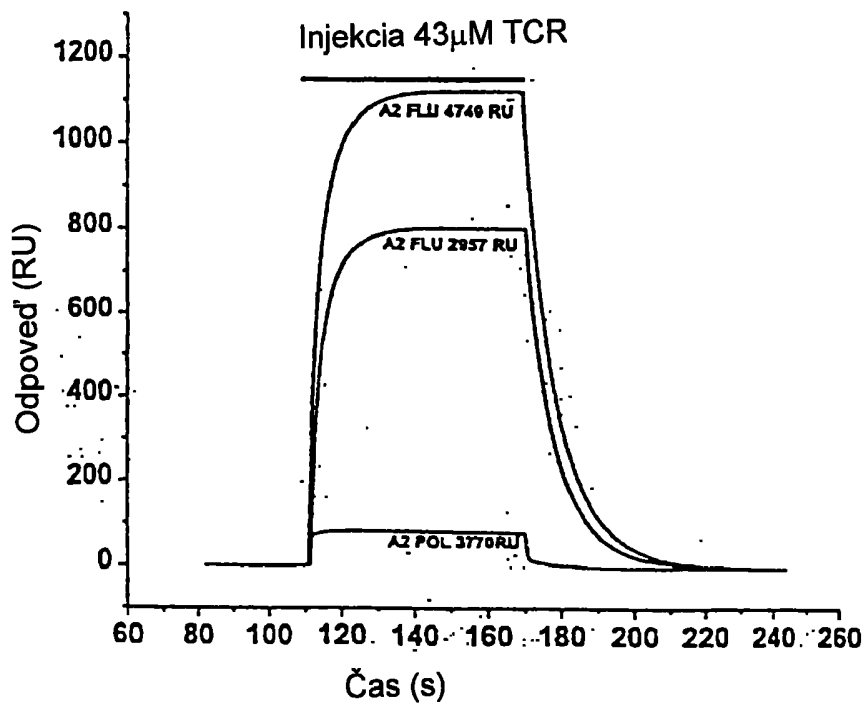
- Schlueter, C. J., B. A. Schodin, a další (1996). *J Mol Biol* 256(5): 859-69
- Schuermann, M., J. B. Hunter, a další (1991). *Nucleic Acids Res* 19(4): 739-46
- Smith, K. J., S. W. Reid, a další (1996). *Immunity* 4(3): 215-28 Issn: 1074-7613
- Smith, K. J., S. W. Reid, a další (1996). *Immunity* 4(3): 203-13 Issn: 1074-7613
- Studier, F. W., A. H. Rosenberg, a další (1990). *Methods Enzymol* 185: 60-89 Issn: 0076-6879
- von Boehmer, H., I. Aifantis, a další (1998). *Immunol Rev* 165: 111-9
- Weber, S., A. Traunecker, a další (1992). *Nature* 356(6372): 793-6 Issn: 0028-0836
- Willcox, B. E., G. F. Gao, a další (1999). *Immunity* 10: 357-65
- Wilson, A. a H. R. MacDonald (1995). *Int Immunol* 7(10): 1659-64 Issn: 0953-8178
- Wurch, A., J. Biro, a další (1998). *J Exp Med* 188(9): 1669-78
- Wyer, J. R., B. E. Willcox, a další (1999). *Immunity* 10: 219-225
- Zhang, Z., A. Murphy, a další (1999). *Curr Biol* 9(8): 417-20



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3

**A**

Poly-C "ukotvovací primer"

Xho I  
5'- TAA ATA CTC GAG GCG CCG CCC CCC CCC CCC CTC -3'

**B**Primer špecifikovaný pre konštantnú oblasť TCR  $\alpha$  reťazca

Xba I  
5'- ATA TAA CCC GGG GAA CCA GAT CCC CAC AGG AAC TTT CTG GGC TGG GGA -3'

**C**Primer špecifikovaný pre konštantnú oblasť TCR  $\beta$  reťazca

Xba I  
5'- ATA TAA CCC GGG GAA CCA GAT CCC CAC AGT CTG CTC TAC CCC AGG CC -3'

A

*c-jun* 5' primer:

Xma I

5' - CATACACCCGGGGTAGAATCGCCCGGCTGGAG -3'

B

*c-jun* 3' primer:

Xho I

5' - GIGIGIGCTCGAGGATCCTAGTAGTTCATGACTTTCIGTTTAAGCTGTGC -3'

Bam HI

C

*c-fos* 5' primer:

Xma I

5' -CATACACCCGGGGTCTGACTGATACTCCAAGCGGAG -3'

D

*c-fos* 3' primer:

Xho I

5' - TGIGIGIGCTCGAGGATCCTAGTAAGCTGCCAGGATGAACTCTAGTTTTTC -3'

Bam HI

A

```

      R   I   A   R   L   E   E   K   V   K   T   L   K
5' - AGA ATC GCC CGG CTG GAG GAA AAA GTG AAA ACC TTG AAA

      A   Q   N   S   E   L   A   S   T   A   N   M   L
      GCT CAG AAC TCG GAG CTG GCG TCC ACG GCC AAC ATG CTC

      R   E   Q   V   A   Q   L   K   Q   K   V   M   N
      AGG GAA CAG GTG GCA CAG CTT AAA CAG AAA GTC ATG AAC

      Y
      TAC - 3'

```

DNA a aminokyselinová (jednopísmenový kód) sekvencia c-jun leucínového zipsu, ako je fúzovaná s TCR  $\alpha$  reťazcom

---

B

```

      L   T   D   T   L   Q   A   E   T   D   Q   L   E
5' - CTG ACT GAT ACA CTC CAA GCG GAG ACA GAC CAA CTA GAA

      D   E   K   S   A   L   Q   T   E   I   A   N   L
      GAT GAG AAG TCT GCT TTG CAG ACC GAG ATT GCC AAC CTG

      L   K   E   K   E   K   L   E   F   I   L   A   A
      CTG AAG GAG AAG GAA AAA CTA GAG TTC ATC CTG GCA GCT

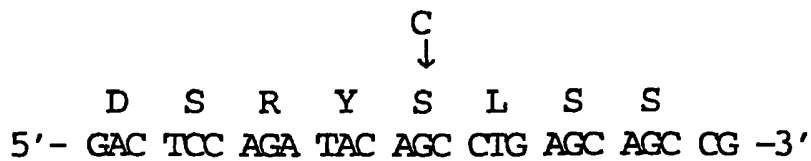
      Y
      TAC - 3'

```

DNA a aminokyselinová (jednopísmenový kód) sekvencia c-fos leucínového zipsu, ako je fúzovaná s TCR  $\alpha$  reťazcom

A

Mutácia cysteínu na serín, priamy (sense) primer, uvedená aminokyselinová sekvencia a označená mutácia



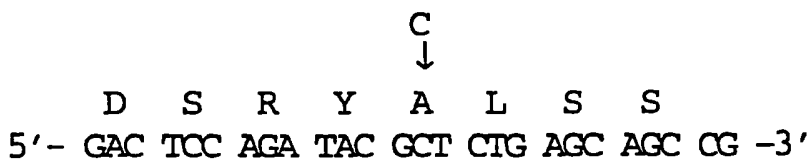
B

Mutácia cysteínu na serín, protismerný (nonsense) primer



C

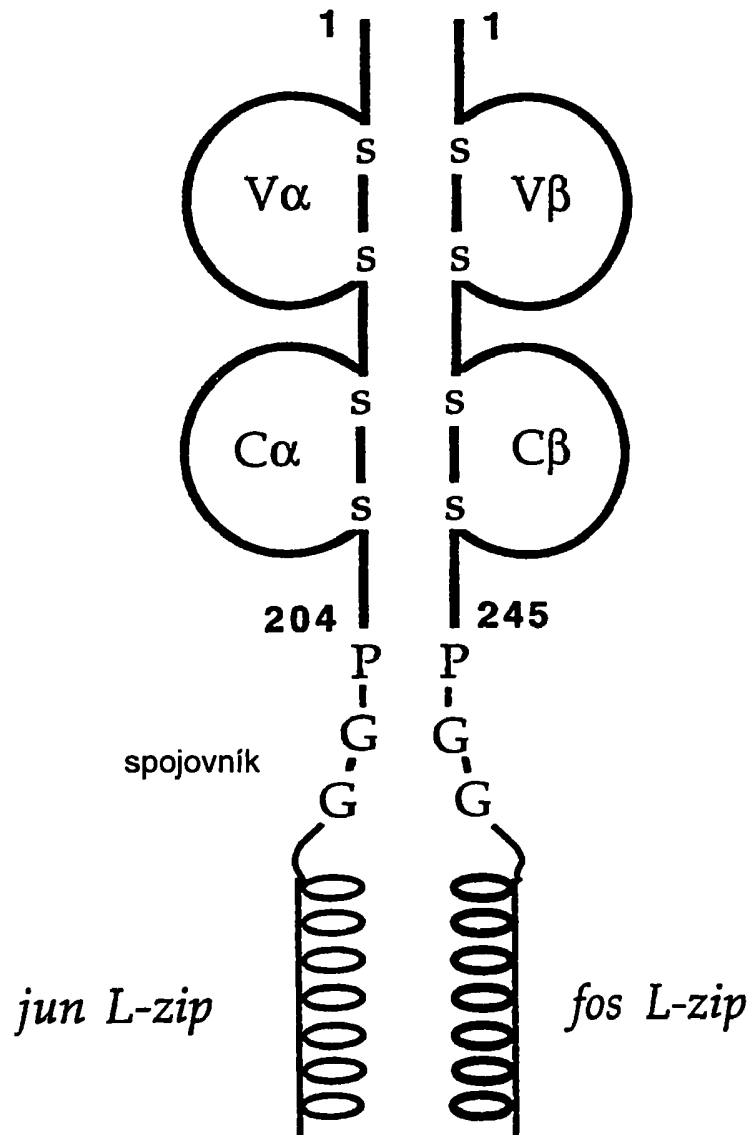
Mutácia cysteínu na alanín, priamy (sense) primer, uvedená aminokyselinová sekvencia a označená mutácia



D

Mutácia cysteínu na alanín, protismerný (nonsense) primer





Obr. 8

**A**

5' PCR primer pre ľudský V $\alpha$ 10.2 JM22 TCR reťazec, ktorý je definovaný Influenza matricovým vírusovým peptidom prezentovaným na HLA-A0201

M Q L L E Q S P Q F L

5' - gctctagacat ATG CAa CTa CTa GAa CAa AGt CCT CAG TTT CTA

Nde I

S I Q E

AGC ATC CAA GAG G -3'

**B**

5' PCR primer pre ľudský V $\beta$ 17 JM22 TCR reťazec, ktorý je definovaný Influenza matricovým vírusovým peptidom prezentovaným na HLA-A0201

M V D G G I T Q S

5' - gctctagacat ATG GTG GAT GGT GGA ATC ACT CAG TCC C -3'

Nde I

**C**

5' PCR primer pre myšací V $\alpha$ 4 TCR reťazec, ktorý je definovaný Influenza nukleoproteínovým peptidom prezentovaným na H2-D<sup>b</sup>

M D S V T Q M Q G Q V

5' - gctctagacat ATG GAT Tct GTt ACT CAa ATG CAa GGT CAa GTG

Nde I

T L S S

ACC CTC TCA TCA G -3'

**D**

5' PCR primer pre myšací V $\beta$ 11 TCR reťazec, ktorý je definovaný Influenza nukleoproteínovým peptidom prezentovaným na H2-D<sup>b</sup>

M E P T N A G V I Q

5'- ~~gctctagacat~~ ATG GAa CCa ACa AAt GcT GgT GtT ATC CAA

T P R H

ACA CCT AGG CAC -3'

**E**

5' PCR primer pre ľudský V $\alpha$ 23 TCR reťazec, ktorý je definovaný 003 HIV-1 Gag peptidom prezentovaným na HLA-A0201

M K Q E V T Q I

5'- ~~ggaattccat~~ atg AAA CAa GAG GtT ACa CAa ATT CC -3'

Nde I

**F**

5' PCR primer pre ľudský V $\beta$ 5.1 TCR reťazec, ktorý je definovaný 003 HIV-1 Gag peptidom prezentovaným na HLA-A0201

M K A G V T Q T

5'- ~~ggaattccat~~ atg AAa GCT GGA GtT ACT CAA ACT CC -3'

**G**

5' PCR primer pre ľudský V $\alpha$ 2.3 A6 TCR reťazec, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax peptidom prezentovaným na HLA-A0201

M Q K E V E Q K

5' -cccccc cat ATG CAG AAG GAA GTG GAG CAG AAC -3'

Nde I

**H**

5' PCR primer pre ľudský V $\beta$ 12.3 A6 TCR reťazec, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax peptidom prezentovaným na HLA-A0201

M K A G V T Q T

5' - ccccc cat ATG AAC GCT GGT GTC ACT CAG ACC -3'

Nde I

**I**

5' PCR primer pre ľudský V $\alpha$ 17.2 reťazec B7 TCR, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax peptidom prezentovaným na HLA-A0201

M Q Q K N D D Q Q V

5' -cccccc cat ATG CAA CAa AAa AAT GAT GAC CAG CAA GTT

Nde I

K Q N

AAG CAA AAT -3'

Obr. 9 - pokračovanie

J

5' PCR primer pre ľudský V $\beta$ 12.3 B7 TCR reťazec, ktorý je definovaný HTLV-1 Tax peptidom prezentovaným na HLA-A0201

5' -cccccc cat ATG AAC GCT GGT GTC ACT CAG ACC CCA AAA TTC  
 M N A G V T Q T P K F  
 Nde I

Q

CAG -3'

K

3' PCR primer pre ľudské C $\alpha$  reťazce, všeobecne použiteľný

5' - cataca ccc ggg GGA ACT TTC TGG GCT GGG GAA GAA GG -3'  
 Xma I

L

3' PCR primer pre ľudské C $\beta$  reťazce, všeobecne použiteľný

5' - cataca ccc ggg GTC TGC TCT ACC CCA GGC CTC -3'  
 Xma I

Obr. 9 - pokračovanie

## TCR alfa&gt;

M Q L L E Q S P Q F L S I Q E G E N L T  
 ATGCAaCTaCTaGAaCAaAGtCCTCAGTTTCTAAGCATCCAAGAGGGAGAAAATCTCACT

V Y C N S S S V F S S L Q W Y R Q E P G  
 GTGTACTGCAACTCCTCAAGTGTMTTCCAGCTTACAATGGTACAGACAGGAGCCTGGG

E G P V L L V T V V T G G E V K K L K R  
 GAAGGTCCTGTCTCTCTGGTGACAGTAGTTACGGGTGGAGAAGTGAAGAAGCTGAAGAGA

L T F Q F G D A R K D S S L H I T A A Q  
 CTAACCTTTTCAGTTTGGTGTATGCAAGAAAGGACAGTTCTCTCCACATCACTGCGGCCAG

P G D T G L Y L C A G A G S Q G N L I F  
 CCTGGTGATACAGGCCCTCTACCTCTGTGCAGGAGCGGGAAGCCAAGGAAATCTCATCTTT

G K G T K L S V K P N I Q N P D P A V Y  
 GGAAAAGGCCTAAACTCTCTGTAAACCAATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTAC

Q L R D S K S S D K S V C L F T D F D S  
 CAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTACCGATTTTGATTCT

Q T N V S Q S K D S D V Y I T D K T V L  
 CAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTA

D M R S M D F K S N S A V A W S N K S D  
 GACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGAC

F A C A N A F N N S I I P E D T F F P S  
 TTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCAATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGC

## &lt;TCR alfa spojovnik c-jun&gt;

P E S S P G G R I A R L E E K V K T L K  
 CCAGAAAGTTCCcccgggGGTAGAATCGCCCGGCTGGAGGAAAAGTGAAAACCTTGAAA

A Q N S E L A S T A N M L R E Q V A Q L  
 GCTCAGAACTCGGAGCTGGCGTCCACGGCCAACATGCTCAGGGAACAGGTGGCACAGCTT

K Q K V M N Y \*  
 AAACAGAAAGTCATGAACTACTAG



## TCR beta&gt;

M V D G G I T Q S P K Y L F R K E G Q N  
 ATGGTGGATGGTGGAACTCACTCAGTCCCCAAAGTACCTGTTTCAGAAAGGAAGGACAGAAT

V T L S C E Q N L N H D A M Y W Y R Q D  
 GTGACCCTGAGTTGTGAACAGAATTTGAACCACGATGCCATGTACTGGTACCGACAGGAC

P G Q G L R L I Y Y S Q I V N D F Q K G  
 CCAGGGCAAGGGCTGAGATTGATCTACTACTCACAGATAGTAAATGACTTTTCAGAAAGGA

D I A E G Y S V S R E K K E S F P L T V  
 GATATAGCTGAAGGGTACAGCGTCTCTCGGGAGAAGAAGGAATCCTTTCTCTCACTGTG

T S A Q K N P T A F Y L C A S S S R S Sq  
 ACATCGGCCCAAAGAACCCGACAGCTTTCTATCTCTGTGCCAGTAGTTTCGAGGAGCTCC

Y E Q Y F G P G T R L T V T E D L K N V  
 TACGAGCAGTACTTCGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGAGGACCTGAAAAACGTT

F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K  
 TTCCACCCGAGGTGCTGTGTTTGAACCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACCCCAAAG

A T L V C L A T G F Y P D H V E L S W W  
 GCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTACCCCGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGG

V N G K E V H S G V S T D P Q P L K E Q  
 GTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACAGACCCCGAGCCCCTCAAGGAGCAG

P A L N D S R Y C L S S R L R V S A T F  
 CCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTC

W Q N P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N  
 TGGCAGAACCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAAT

D E W T Q D R A K P V T Q I V S A E A W  
 GACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCTGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTGG

## &lt;TCR beta spojovnik c-fos&gt;

G R A D P G G L T D T L Q A E T D Q L E  
 GGTAGAGCAGACccccgggGGTCTGACTGATACACTCCAAGCGGAGACAGATCAACTTGAA

D K K S A L Q T E I A N L L K E K E K L  
 GACAAGAAGTCTGCGTTCAGACCGAGATTGCCAATCTACTGAAAGAGAAGGAAAAACTA

E F I L A A Y \*  
 GAGTTCATCCTGGCAGCTTACTAG

## TCR alfa&gt;

M N Y S P A L V T V M L F V F G R T H G  
 ATGAACTATTCCTCCAGCTTTAGTGACTGTGATGCTGTTTGTGTTTGGGAGGACCCATGGA

D S V T Q M Q G Q V T L S E D D F L F I  
 GACTCAGTAACCCAGATGCAAGGTCAAGTGACCCCTCAGAAAGACGACTTCCTATTTATA

N C T Y S T T W Y P T L F W Y V Q Y P G  
 AACTGTACTTATTCACCCACATGGTACCCGACTCTTTTCTGGTATGTCCAATATCCTGGA

E G P Q L L L K V T T A N N K G I S R G  
 GAAGGTCCACAGCTCCTTTTGAAAAGTCACAACAGCCAACAACAAGGGAATCAGCAGAGGT

F E A T Y D K G T T S F H L Q K A S V Q  
 TTTGAAGCTACATATGATAAAGGAACAACGTCCTTCCACTTGCAGAAAGCCTCAGTGCAG

E S D S A V Y Y C V L G D R Q G G R A L  
 GAGTCAGACTCTGCTGTGTACTACTGTGTGCTGGGTGATCGACAGGGAGGCAGAGCTCTG

I F G T G T T V S V S P N I Q N P E P A  
 ATATTTGGAACAGGAACCACGGTATCAGTCAGCCCCAACATCCAGAACCCAGAACCTGCT

V Y Q L K D P R S Q D S T L C L F T D F  
 GTGTACCAGTTAAAAGATCCTCGGTCTCAGGACAGCACCCCTCGCTGTTCCACCGACTTT

D S Q I N V P K T M E S G T F I T D K T  
 GACTCCCAATCAATGTGCCGAAAACCATGGAATCTGGAAACGTTCACTGACAAAAC

V L D M K A M D S K S N G A I A W S N Q  
 GTGCTGGACATGAAAGCTATGGATTCCAAGAGCAATGGGGCCATTGCTGAGCAACCAG

T S F T C Q D I S K E T N A T Y P S S D  
 ACAAGCTTACCTGCCAAGATATCTCCAAGAGACCAACGCCACCTACCCAGTTTCAGAC

## &lt;TCR alfa spojovník c-jun&gt;

V P G G R I A R L E E K V K T L K A Q N  
 GTTccccgggGGTAGAATCGCCCGGCTGGAGGAAAAGTAAAACCTTGAAAGCTCAGAAC

S E L A S T A N M L R E Q V A Q L K Q K  
 TCGGAGCTGGCGTCCACGGCCAACATGCTCAGGGAACAGGTGGCACAGCTTAAACAGAAA

V M N Y \*  
 GTCATGAACTACTAG

TCR beta>  
M K A G V T Q T P R Y L I K T R G Q Q V  
ATGAAAGCTGGAGTFACTCAAACCTCCAAGATATCTGATCAAACGAGAGGACAGCAAGTG  
T L S C S P I S G H R S V S W Y Q Q T P  
ACACTGAGCTGCTCCCTATCTCTGGGCATAGGAGTGTATCCTGGTACCAACAGACCCCA  
G Q G L Q F L F E Y F S E T Q R N K G N  
GGACAGGGCCTTCAGTTCCTCTTTGAATACTTCAGTGAGACACAGAGAAACAAAGGAAAC  
F P G R F S G R Q F S N S R S E M N V S  
TTCCCTGGTGCATCTCAGGGCGCCAGTCTCTAACTCTCGCTCTGAGATGAATGTGAGC  
T L E L G D S A L Y L C A S S F D S G N  
ACCTTGGAGCTGGGGGACTCGGCCCTTTATCTTTGCGCCAGCAGCTTCGACAGCGGGAAT  
S P L H F G N G T R L T V T E D L N K V  
TCACCCCTCCACTTTGGGAACGGGACCAGGCTCACTGTGACAGAGGACCTGAACAAGGTG  
F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K  
TTCCACCCGAGGTGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACCCAAAAG  
A T L V C L A T G F F P D H V E L S W W  
GCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTTCCTGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGG  
V N G K E V H S G V S Q D P Q P L K E Q  
GTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCCAGGACCCGAGCCCCTCAAGGAGCAG  
P A L N D S R Y S L S S R L R V S A T F  
CCCGCCCTCAATGACTCCAGATACAGCCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGCCACCTTC  
W Q N P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N  
TGGCAGAACCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAAT  
D E W T Q D R A K P V T Q I V S A E A W  
GACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCTGTCAACCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTGG  
<TCR beta spojovnik c-fos>  
G R A D P G G L T D T L Q A E T D Q L E  
GGTAGAGCAGACCCCGGGGTCTGACTGATACTCCAAGCGGAGACAGATCAACTTGAA  
D K K S A L Q T E I A N L L K E K E K L  
GACAAGAAGTCTGCGTTGCAGACCCGAGATTGCCAATCTACTGAAAGAGAAGGAAAAACTA  
E F I L A A Y \*  
GAGTTCATCCTGGCAGCTTACTAG

## TCR alfa&gt;

M K Q E V T Q I P A A L S V P E G E N L  
 ATGAAACAAGAAGTTACACAGATTCCCTGCAGCTCTGAGTGTCCAGAAGGAGAAAACCTG

V L N C S F T D S A I Y N L Q W F R Q D  
 GTTCTCAACTGCAGTTTCACTGATAGCGCTATTTACAACCTCCAGTGGTTTAGGCAGGAC

P G K G L T S L L L I Q S S Q R E Q T S  
 CCTGGGAAAGGTCACATCTCTGTTGCTTATTCAAGTCAAGTCAGAGAGAGCAAACAAGT

G R L N A S L D K S S G R S T L Y I A A  
 GGAAGACTTAATGCCTCGCTGGATAAATCATCAGGACGTAGTACTTTATACATTGCAGCT

S Q P G D S A T Y L C A V T N F N K F Y  
 TCTCAGCCTGGTGACTCAGCCACCTACCTCTGTGCTGTGACCAACTTCAACAAATTTTAC

F G S G T K L N V K P N I Q N P D P A V  
 TTTGGATCTGGGACCAAACCTCAATGTAAAACCAAATATCCAGAACCCTGACCCTGCCCGT

Y Q L R D S K S S D K S V C L F T D F D  
 TACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGAT

S Q T N V S Q S K D S D V Y I T D K T V  
 TCTCAACAAATGTGTCAAAAGTAAGGATTTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTG

L D M R S M D F K S N S A V A W S N K S  
 CTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCT

D F A C A N A F N N S I I P E D T F F P  
 GACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCC

## &lt;TCR alfa spojovnik c-jun&gt;

S P E S S P G G R I A R L E E K V K T L  
 AGCCCAGAAAGTTCCcccgggGGTAGAATCGCCCGGCTGGAGGAAAAGTGAAAACCTTG

K A Q N S E L A S T A N M L R E Q V A Q  
 AAAGCTCAGAACTCGGAGCTGGCGTCCACGGCCAACATGCTCAGGGAACAGGTGGCACAG

L K Q K V M N Y \*  
 CTTAAACAGAAAGTCATGAACTACTAG

TCR beta>  
M K A G V T Q T P R Y L I K T R G Q Q V  
ATGAAAGCTGGAGTTACTCAAACCTCCAAGATATCTGATCAAAACGAGAGGACAGCAAGTG  
T L S C S P I S G H R S V S W Y Q Q T P  
ACACTGAGCTGCTCCCCATCTCTGGGCATAGGAGTGTATCCTGGTACCAACAGACCCCA  
G Q G L Q F L F E Y F S E T Q R N K G N  
GGACAGGGCCTTCAGTTCCTCTTTGAATACTTCAGTGAGACACAGAGAAACAAAGGAAAC  
F P G R F S G R Q F S N S R S E M N V S  
TTCCCTGGTCGATTCTCAGGGGCGCCAGTTCCTAACTCTCGCTCTGAGATGAATGTGAGC  
T L E L G D S A L Y L C A S S F D S G N  
ACCTTGGAGCTGGGGGACTCGGCCCTTTATCTTTGCGCCAGCAGCTTCGACAGCGGGAAT  
S P L H F G N G T R L T V T E D L N K V  
TCACCCCTCCACTTTGGGAACGGGACCAGGCTCACTGTGACAGAGGACCTGAACAAGGTG  
F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K  
TTCCACCCGAGGTGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACCCAAAAG  
A T L V C L A T G F F P D H V E L S W W  
GCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTCCCTGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGG  
V N G K E V H S G V S Q D P Q P L K E Q  
GTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCCAGGACCCGAGCCCTCAAGGAGCAG  
P A L N D S R Y S L S S R L R V S A T F  
CCCGCCCTCAATGACTCCAGATACAGCCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGCCACCTTC  
W Q N P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N  
TGGCAGAACCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCACGGGCTCTCGGAGAAT  
D E W T Q D R A K P V T Q I V S A E A W  
GACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCTGTCAACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTGG  
<TCR beta spojovník c-fos>  
G R A D P G G L T D T L Q A E T D Q L E  
GGTAGAGCAGACcccgggGGTCTGACTGATACACTCCAAGCGGAGACAGATCAACTTGAA  
D K K S A L Q T E I A N L L K E K E K L  
GACAAGAAGTCTGCGTTGCAGACCCGAGATTGCCAATCTACTGAAAGAGAAGGAAAACTA  
E F I L A A Y \*  
GAGTTCATCCTGGCAGCTTACTAG

## TCR alfa&gt;

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A  
 atgCAGAAAGGAAGTGGAGCAGAACTCTGGACCCCTCAGTGTCCAGAGGGAGCCATTGCC

S L N C T Y S D R G S Q S F F W Y R Q Y  
 TCTCTCAACTGCACTTACAGTGAACGAGGTGCCAGTCTCTCTCTGGTACAGACAATAT

S G K S P E L I M S I Y S N G D K E D G  
 TCTGGCAAAGCCCTGAGTGTATAATGTCCATATACTCCAATGGTGACAAAGAGATGGA

R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S  
 AGGTTTACAGCACAGCTCAATAAAGCCAGCCAGTATGTTTCTCTGCTCATCAGAGACTCC

Q P S D S A T Y L C A V T T D S W G K L  
 CAGCCAGTGAATTCAGCCACCTACCTCTGTGCGTTACAAC TGACAGCTGGGGGAAATTC

Q F G A G T Q V V V T P D I Q N P D P A  
 CAGTTTGGAGCAGGGACCCAGGTGTGGTACCCCCAGATATCCAGAACCCTGACCCCTGCC

V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T D F  
 GTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCTTATTCACCGATTTT

D S Q T N V S Q S K D S D V Y I T D K T  
 GATCTCTCAAACAAATGTGTGCACAAAGTAAGGATTCGTATGTGTATATCAGACAAAACCT

V L D M R S M D F K S N S A V A W S N K  
 GTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTGGCCCTGGAGCAACAAA

S D F A C A N A F N N S I I P E D T F F  
 TCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCCTTCAACAACAGCATTATTCAGAAAGACACCTTCTTC

## &lt;TCR alfa spojovnik c-jun&gt;

P S P E S S P G G R I A R L E E K V K T  
 CCCAGCCAGAAAGTTCcccgggGTAGAAATGGCCCGGCTGGAGGAAAAAGTGAAAACC

L K A Q N S E L A S T A N M L R E Q V A  
 TTGAAAGCTCAGAACTGGAGCTGGCGTCCACGGCCAACATGCTCAGGGAAACAGGTGGCA

Q L K Q K V M N Y \*  
 CAGCTTAAACAGAAAGTCATGAACTACTAG

## TCR beta&gt;

M N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M  
atgAACGCTGGTGTCACTCAGACCCCCAAATTCAGGTCCTGAAGACAGGACAGAGCATG

T L Q C A Q D M N H E Y M S W Y R Q D P  
ACACTGCAGTGTGCCAGGATATGAACCATGAATACATGTCTCTGGTATCGACAAGACCCA

G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q G E  
GGCATGGGGCTGAGGCTGATTCATTACTCAGTTGGTCTGGTATCACTGACCAAGCAGAA

V P N G Y N V S R S T T E D F P L R L L  
GTCCCCAATGGCTACAATGTCTCCAGATCAACCACAGAGGATTTCCCCCTCAGGCTGCTG

S A A P S Q T S V Y F C A S R P G L A G  
TGGCTGTCTCCCTCCACACATCTGTGTACTTCTGTGOCAGCAGGCGGGACTAGCGGGA

G R P E Q Y F G P G T R L T V T E D L K  
GGGOGAACCAGAGCAGTACTTGGGGCGGGCACCAGGCTCAOGGTCAAGAGGACCTGAAA

N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T  
AAGTGTTCOCCACCCGAGGTGGCTGTGTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTOCCACACC

Q K A T L V C L A T G F Y P D H V E L S  
CAAAGGCCACACTGGTGTGCTGGCCACAGGCTCTCAACCCGACCAAGTGGAGCTGAGC

W W V N G K E V H S G V S T D P Q P L K  
TGGTGGGTGAATGGGAAGGAGGTGCCACAGTGGGGTCAGCACAGACCCGACGCCCCCTCAG

E Q P A L N D S R Y L S S R L R V S A  
GAGCAGCCCGCCTCAATGACTCCAGATAGCTCTGAGCAGCCCGCCTCAGGGTCTGGCC

T F W Q N P R N H F R C Q V Q F Y G L S  
ACCTTCTGGCAGAACCCCGCAACCCTTCCGCTGTCAAGTCCAGTCTCAAGGGCTCTCG

E N D E W T Q D R A K P V T Q I V S A E  
GAGAATGACAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCTGTCAOCCAGATGGTCAAGCCCGAG

<TCR beta spojovník<sub>c-fos</sub>>

A W G R A D P G G L T D T L Q A E T D Q  
GCCTGGGGTAGAGCAGACCCCCGGGGTCTGACTGATCACTCCAAGCGGAGACAGATCAA

pokračovanie....

L E D K K S A L Q T E I A N L L K E K E  
C T T G A A G A C A A G A G T C T G G T T G C A G A C C G A G A T T G C C A A T C T A C T G A A G A G A A G G A A

spojovník Biotinylačný privesok >

K L E F I L A A Y G S G G G L N D I F E  
A A A C T A G A G T T C A T C C T G G C A G C T T A C g g a t c c G G T G G T G G T C T G A A C G A T A T T T T T G A A

A Q K I E W H \*  
G C T C A G A A A A T O G A A T G G C A T T A A G C T T

Obr. 17 - pokračovanie

## TCR alfa&gt;

M Q Q K N D D Q Q V K Q N S P S L S V Q  
atgCAACAGAAGAATGATGACCAGCAAGTTAAGCAAATTCACCATCCCTGAGCGTCCAG

E G R I S I L N C D Y T N S M F D Y F L  
GAAGGAAGAATTTCTATTTCGAACTGTGACTATACTAACAGCATGTTTGATTATTTCCTA

W Y K K Y P A E G P T F L I S I S S I K  
TGGTACAAAAATACCCCTGCTGAAGGTCCTACATTCCCTGATATCTATAAGTTCATTAAAG

D K N E D G R F T V F L N K S A K H L S  
GATAAAAATGAAGATGGAAGATTCACTGTCTTCTTAAACAAAAGTGCCAAGCACCTCTCT

L H I V P S Q P G D S A V Y F C A A M E  
CTGCACATTGTGCCCTCCAGCCTGGAGACTCTGCAGTGTACTTCTGTGCAGCAATGGAG

G A Q K L V F G Q G T R L T I N P N I Q  
GGAGCCAGAAAGCTGGTATTTGGCCAAGGAACCAGGCTGACTATCAACCCAAATATCCAG

N P D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C  
AACCCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGC

L F T D F D S Q T N V S Q S K D S D V Y  
CTATTACCCGATTTTGATTCTCAACAAATGTGTGACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTAT

I T D K T V L D M R S M D F K S N S A V  
ATCACAGACAAAATCTGTCTAGACATGAGGTCATGGACTTCAAGAGCAACAGTCTGTG

A W S N K S D F A C A N A F N N S I I P  
GCCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCAITGTGCAAAACGCCCTTCAACAACAGCATTATTOCA

## &lt;TCR alfa spojovnik c-jun&gt;

E D T F F P S P E S S P G G R I A R L E  
GAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGAAAGTTCcctcggggGGTAGAATCGCCCGGCTGGAG

E K V K T L K A Q N S E L A S T A N M L  
GAAAAAGTGAAAACCTTGAAAGCTCAGAAGCTCGGAGCTGGCGTCCACGGCCAACATGCTC

R E Q V A Q L K Q K V M N Y \*  
AGGGAACAGGTGGCACAGCTTAAACAGAAAGTCATGAACTACTAG

## TCR beta&gt;

M N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M  
atgAAGCGTGGTGTCACTCAGACCCCAAAATTCAGGTCCTGAAGACAGGACAGAGCATG

T L Q C A Q D M N H E Y M S W Y R Q D P  
ACACTGCAGTGTGCCCAGGATATGAACCATGAATACATGTCTGGTATOGACAAGACCCA

G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q G E  
GGCATGGGGCTGAGGCTGATTCATTACTCAGTTGGTGTCTGGTATCACTGACCAAGGAGAA

V P N G Y N V S R S T T E D F P L R L L  
GTCCCCAATGGCTACAATGTCTCCAGATCAACCACAGAGGATTTCCCGCTCAGGCTGCTG

S A A P S Q T S V Y F C A S S Y P G G G  
TCGGCTGCTCCCTCCGACATCTGTGTACTTCTGTGCCAGCAGTTACCAGGAGGGGGGG

F Y E Q Y F G P G T R L T V T E D L K N  
TTTTACGAGCAGTACTTCCGGCCCGGGCACCAGGCTCAGGGTCAAGAGGACCTGAAAAAC

V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q  
GTGTCCACCCGAGGTGGCTGTGTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACCCAA

K A T L V C L A T G F Y P D H V E L S W  
AAGGCCACACTGGTGTGCTGGCCACAGGCTTCTACCCCGACCAAGTGGAGCTGAGCTGG

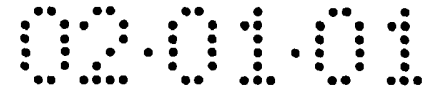
W V N G K E V H S G V S T D P Q P L K E  
TGGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACAGACCCGACAGCCCTCAAGGAG

Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T  
CAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATAAGCTCTGAGCCAGCCGCTGAGGGTCTCGGCCACC

F W Q D P R N H F R C Q V Q F Y G L S E  
TTCTGGCAGgACCCCCGCAACCACITCCGCTGTCAAGTCCAGTTCACGGGGCTCTGGGAG

N D E W T Q D R A K P V T Q I V S A E A  
AATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAGGCGGAGGCC

pokračovanie ..



<TCR beta spojovník c-fos>

W G R A D P G G L T D T L Q A E T D Q L  
 TGGGGTAGAGCAGACcccgggGGTCTGACTGATACACTCCAAGCGGAGACAGATCAACTT

E D K K S A L Q T E I A N L L K E K E K  
 GAAGACAAGAAGTCTGGGTTCAGACCGGACATTGCCAATCTACTGAAAGAGAAGGAAAA

spojovník Biotinylačný príviesok?

L E F I L A A Y G S G G G L N D I F E A  
 CTAGAGTICATCTGGCAGCTTACggatccGGTGGTGGTCTGAACGATATTTTGAAGCT

Q K I E W H \*  
 CAGAAAATCGAATGGCATTAGCTT

Obr. 19 - pokračovanie

TCR beta>  
M N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M  
atgAAAGCTGGTGTCACTCAGACCCCAAAATTCAGGTCCTGAAGACAGGACAGAGCATG  
T L Q C A Q D M N H E Y M S W Y R Q D P  
ACACTGCAAGTGTGCCAGGATATGAACCATGAATACATGTCCTGGTATOGACAAGACCCA  
G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q G E  
GGCATGGGGCTGAGGCTGATTCATTACTCAGTTGGTGTGGTATCACTGACCAAGGAGAA  
V P N G Y N V S R S T T E D F P L R L L  
GTCCCAATGGCTACAATGTCTOCAGATCAACCACAGAGGATTTCCCGCTCAGGCTGCTG  
S A A P S Q T S V Y F C A S R P G L A G  
TOGGCTGCTCCCTCCAGCATCTGTGTACTTCTGTGCCAGCAGGCGGGACTTAGGGGA  
G R P E Q Y F G P G T R L T V T E D L K  
GGGOGACCAAGCAGTACTTCCGGGCGGGCACCAAGGCTCAAGGTCACAGAGGACCTGAAA  
N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T  
AAGTGTTCACCCGAGGTCGCTGTGTGTGAGCCATCAGAGCAGAGATCTCCACACC  
Q K A T L V C L A T G F Y P D H V E L S  
CAAAAGGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTACCCCGACCAAGTGGAGCTGAGC  
W W V N G K E V H S G V S T D P Q P L K  
TGGTGGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACAGACCCCGAGCCCTCAAG  
E Q P A L N D S R Y ~~L~~ L S S R L R V S A  
GAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATAC~~CT~~CTGAGCAGCCCGCTGAGGGTCTGGCC  
T F W Q ~~D~~ P R N H F R C Q V Q F Y G L S  
ACCTTCTGGCAG~~g~~ACCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCG  
E N D E W T Q D R A K P V T Q I V S A E  
GAGAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCTGTACCCCAATGTCAGCCGCGAG

pokračovanie...

<TCR beta spojovník c-fos>

A W G R A D P G G L T D T L Q A E T D Q  
 GCCTGGGGTAGAGCAGACcccggggGGTCTGACTGATACACTCCAAGGGAGACAGATCAA

L E D K K S A L Q T E I A N L L K E K E  
 CTTCAGACAAGAAGTCTGGGTTGCAGACCGAGATTGCCANTCTACTGAAAGAGAAGGAA

spojovník Biotinylačný privesok?

K L E F I L A A Y G S G G G L N D I F E  
 AAACCTAGAGTTCACTCTGGCAGCTTACgggatccGGTGGTGGTCTGAACGATATTTTTGAA

A Q K I E W H \*  
 GCTCAGAAAATCGAATGGCATTAGCTT

Obr. 20 - pokračovanie

spojovník <-> fos  
 P G G L T D T L Q A E T D Q  
 5' - ccc ggg GGT CTG ACT GAT ACA CTC CAA GCG GAG ACA GAT CAA  
 Xma I

L E D K K S A L Q T E I A N L  
 CTT GAA GAC AAG AAG TCT GCG TTG CAG ACC GAG ATT GCC AAT CTA

<-lin  
 L K E K E K L E F I L A A Y G  
 CTG AAA GAG AAG GAA AAA CTA GAG TTC ATC CTG GCA GCT TAC ggg  
 Bam

Ker-> <- Biotinyláčný privesok  
 S G G G L N D I F E A Q K I E  
tcc GGT GGT GGT CTG AAC GAT ATT TTT GAA GCT CAG AAA ATC GAA  
 HI

W H \*  
 TGG CAT TAA GCT T -3'  
 Hind III

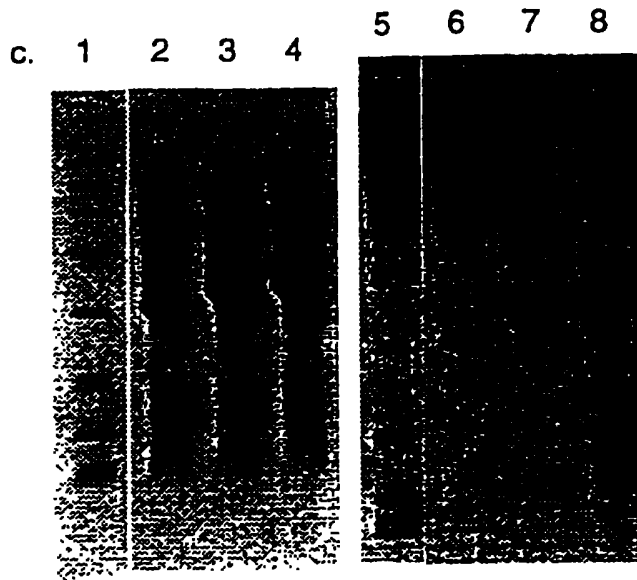
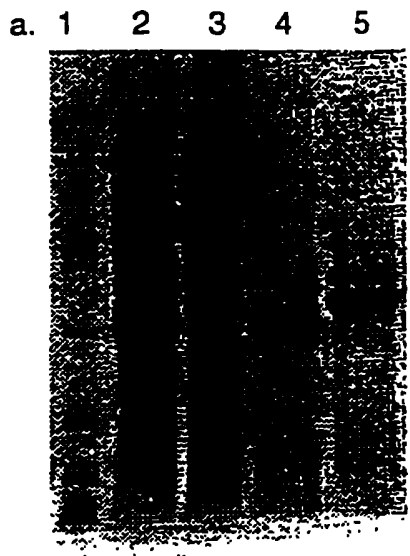
**A**

Reverzný primer

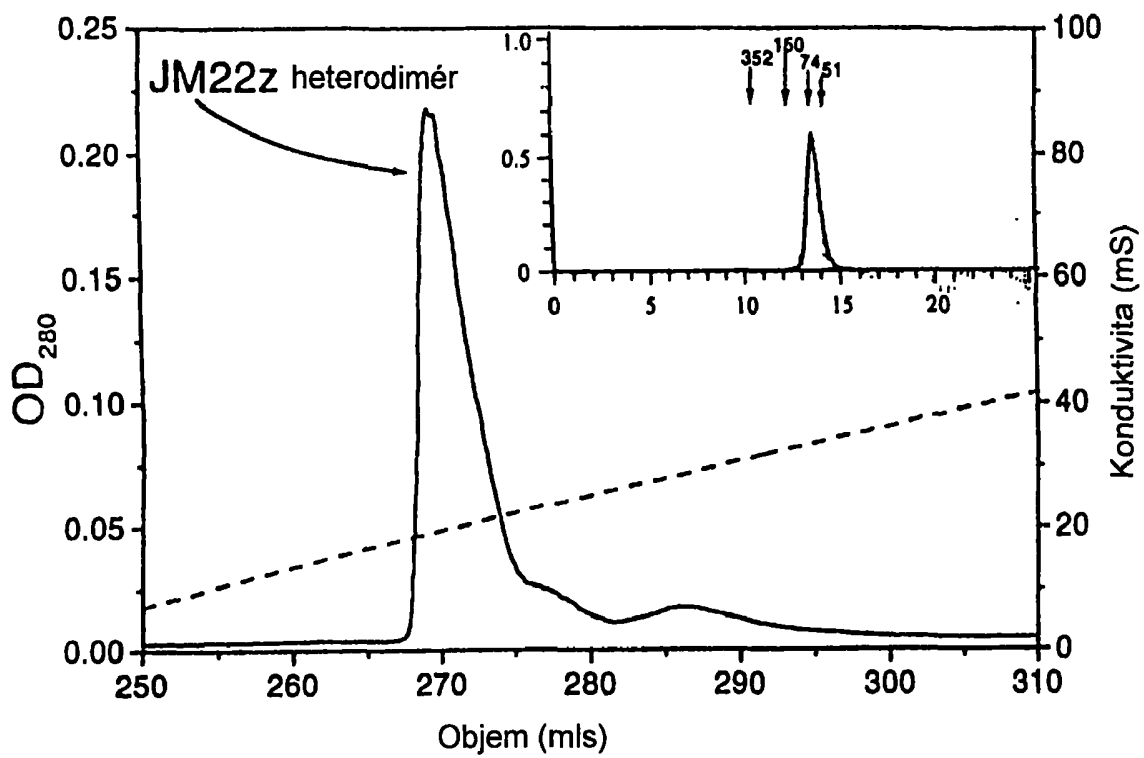
5' -ACACAC GGA TCC GTA AGC TGC GAC GAT GAA CTC GAT TTT CTT-  
3'

Bam HI

Obr. 22



Obr. 23

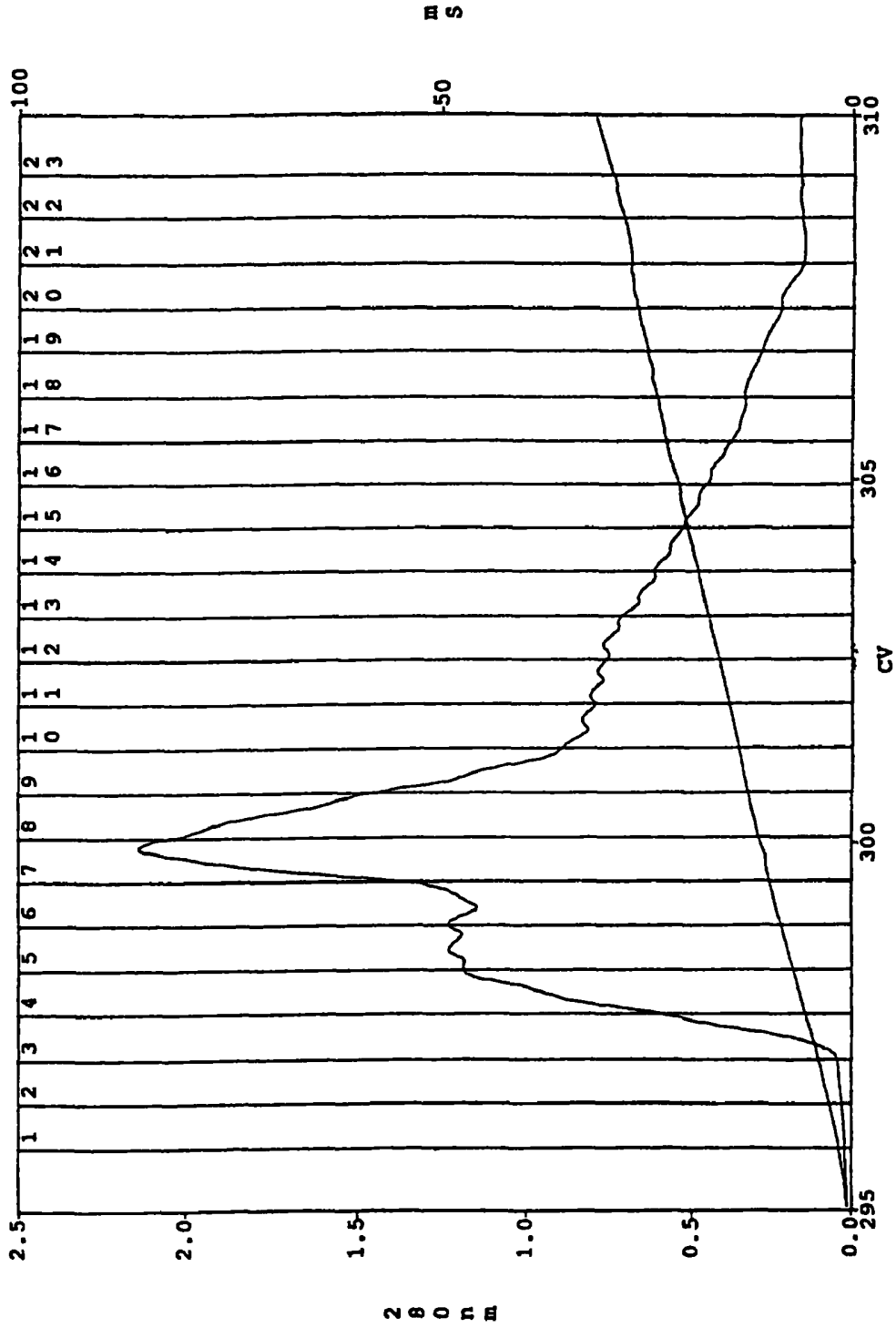


Obr. 24



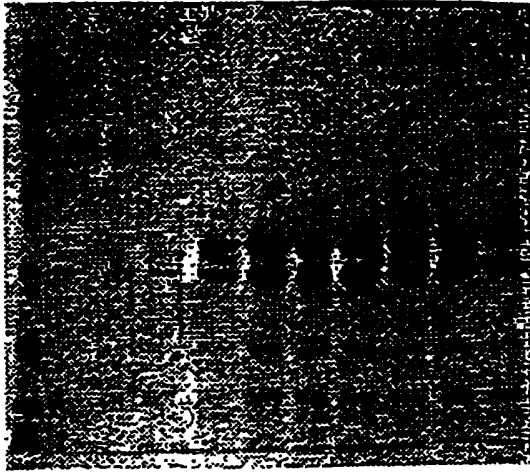
Obr. 25





Obr. 26bi

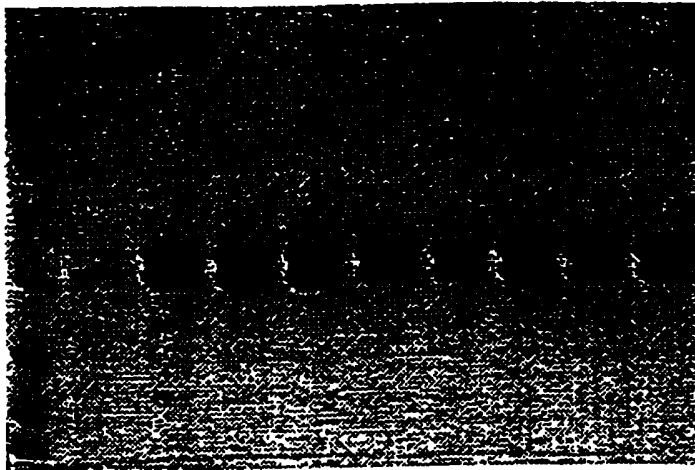
a.ii. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



a.iii. 1 2

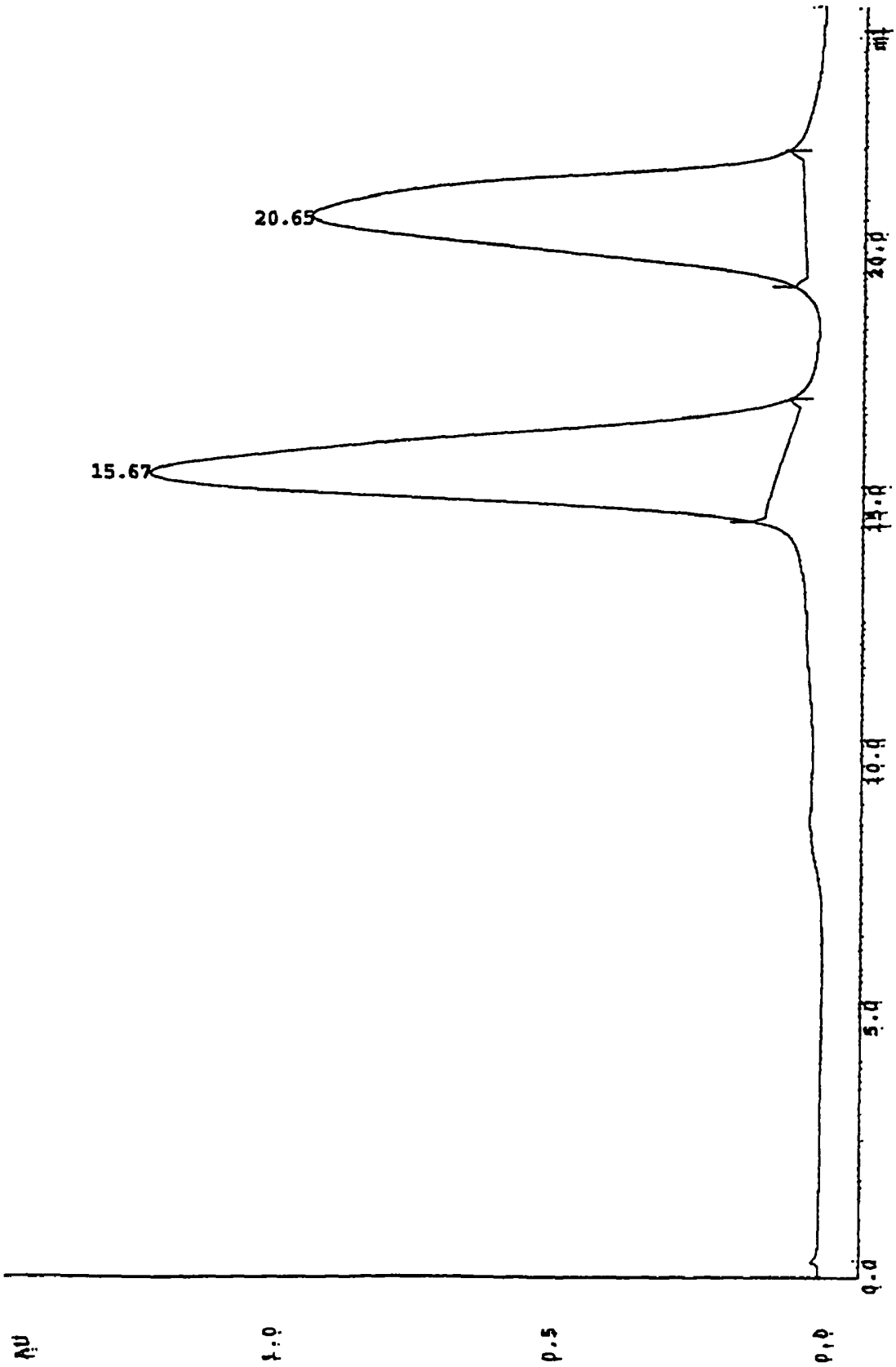


b.ii. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

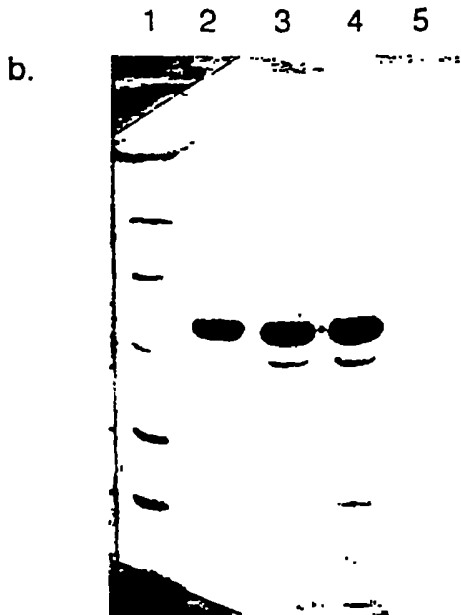
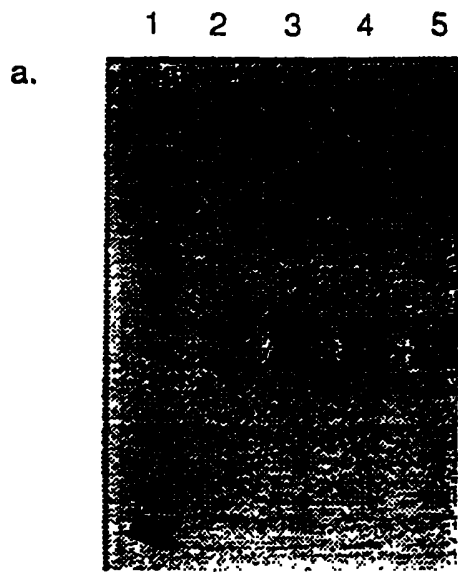


b.iii. 1 2 3

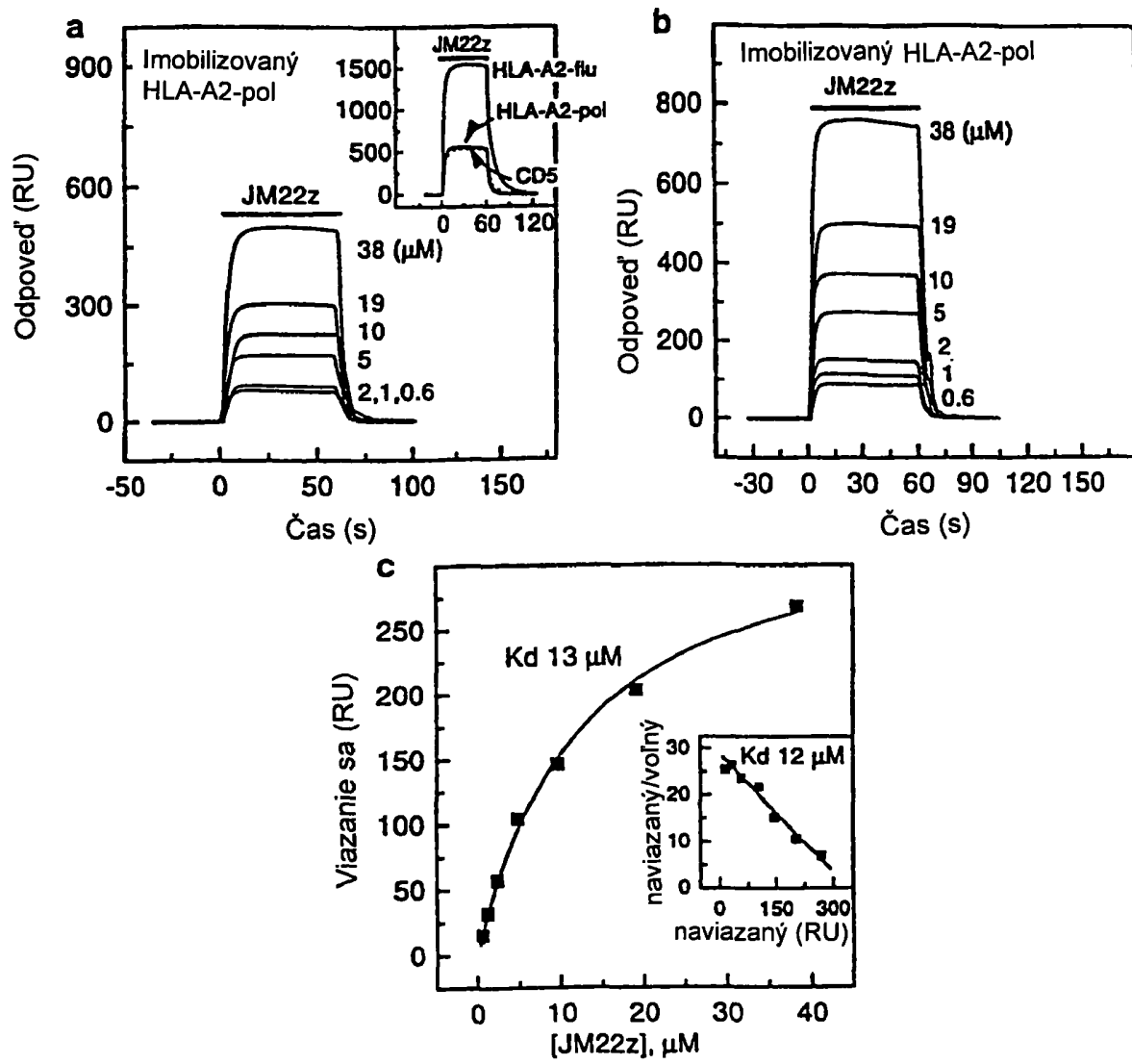




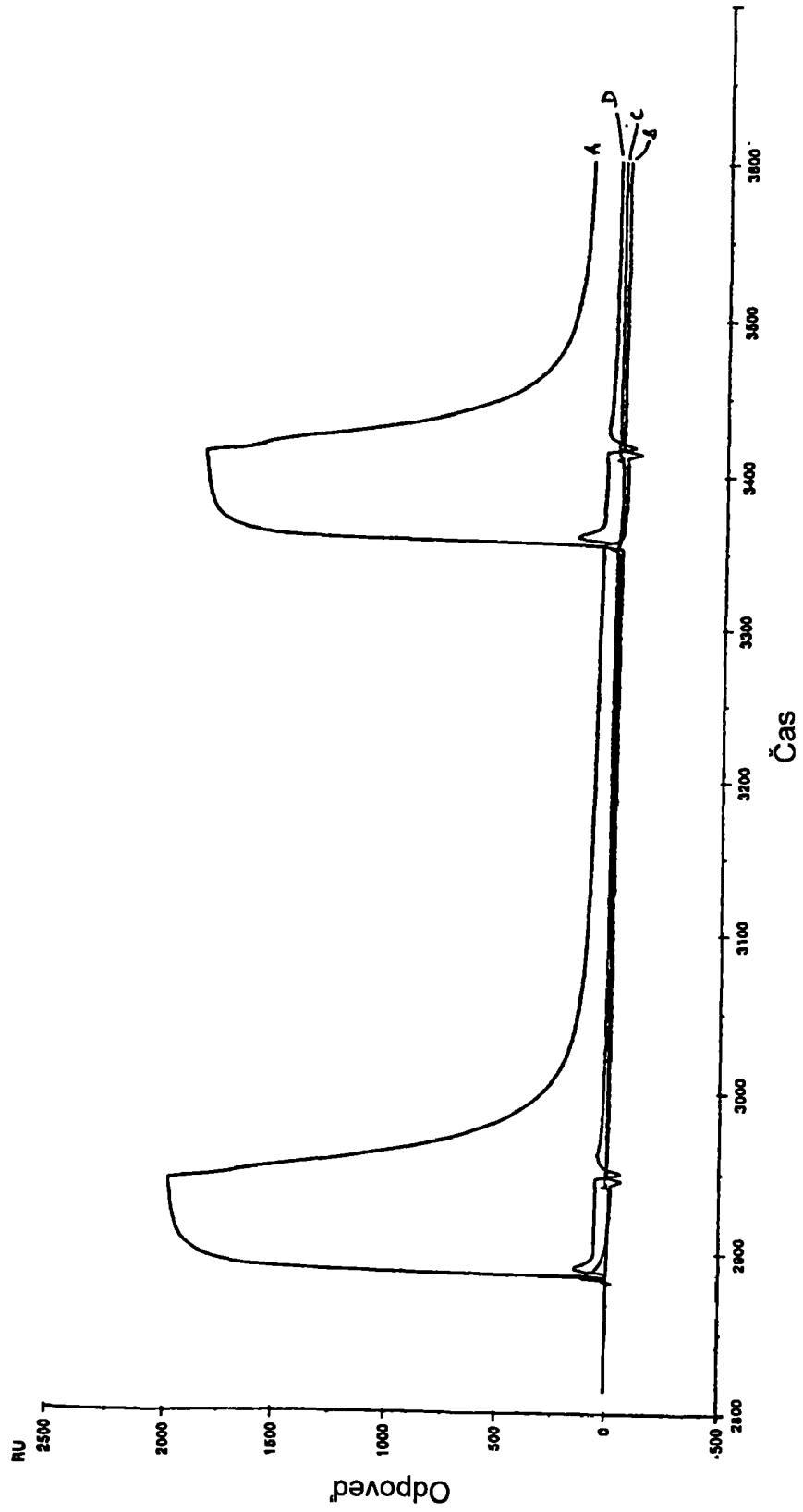
Obr. 27



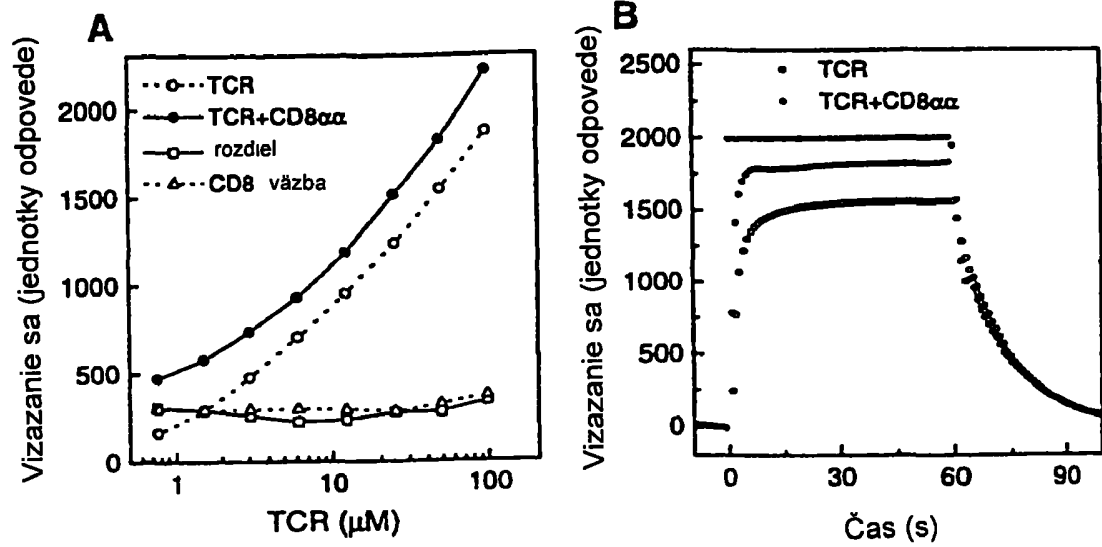
Obr. 28



Obr. 29



Obr. 30



Obr. 31

## TCR alfa&gt;

M Q L L E Q S P Q F L S I Q E G E N L T  
 ATGCAaCTaCTaGAaCaAGtCCTCAGTTTCTAAGCATCCAAGAGGGAGAAAATCTCACT

V Y C N S S S V F S S L Q W Y R Q E P G  
 GTGTA CTGCAACTCCTCAAGTGTTTTTCCAGCTTACAATGGTACAGACAGGAGCCTGGG

E G P V L L V T V V T G G E V K K L K R  
 GAAGGTCCTGTCTCTGGTGACAGTAGTTACGGGTGGAGAAGTGAAGAAGCTGAAGAGA

L T F Q F G D A R K D S S L H I T A A Q  
 CTAACCTTTTCAGTTTGGTGATGCAAGAAAGGACAGTTCTCTCCACATCACTGCGGCCAG

P G D T G L Y L C A G A G S Q G N L I F  
 CCTGGTGATACAGGCCTCTACCTCTGTGCAGGAGCGGGAAGCCAAGGAAATCTCATCTTT

G K G T K L S V K P N I Q N P D P A V Y  
 GGAAAAGGCACTAAACTCTCTGTAAACCAAATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTAC

Q L R D S K S S D K S V C L F T D F D S  
 CAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCT

Q T N V S Q S K D S D V Y I T D K T V L  
 CAAACAAATGTGTCAAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTA

D M R S M D F K S N S A V A W S N K S D  
 GACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGAC

F A C A N A F N N S I I P E D T F F P S  
 TTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGC

## &lt;TCR alfa spojovník c-jun&gt;

P E S S P G G R I A R L E E K V K T L K  
 CCAGAAAGTTCccccgggGGTAGAATCGCCCGGCTGGAGGAAAAAGTAAAAACCTTGAAA

A Q N S E L A S T A N M L R E Q V A Q L  
 GCTCAGAACTCGGAGCTGGCGTCCACGGCCAACATGCTCAGGGAACAGGTGGCACAGCTT

K Q K V M N Y \*

AAACAGAAAGTCATGAACACTAG

## TCR beta&gt;

M V D G G I T Q S P K Y L F R K E G Q N  
ATGGTGGATGGTGAATCACTCAGTCCCCAAAGTACCTGTTTCAGAAAGGAAGGACAGAAT  
  
V T L S C E Q N L N H D A M Y W Y R Q D  
GTGACCCTGAGTTGTGAACAGAATTTGAACCACGATGCCATGTACTGGTACCGACAGGAC  
  
P G Q G L R L I Y Y S Q I V N D F Q K G  
CCAGGGCAAGGGCTGAGATTGATCTACTACTCACAGATAGTAAATGACTTTCAGAAAGGA  
  
D I A E G Y S V S R E K K E S F P L T V  
GATATAGCTGAAGGGTACAGCGTCTCTCGGGAGAAGAAGGAATCCTTTCCTCTCACTGTG  
  
T S A Q K N P T A F Y L C A S S S R S S  
ACATCGGCCCAAAGAACCCGACAGCTTCTATCTCTGTGCCAGTAGTTCGAGGAGCTCC  
  
Y E Q Y F G P G T R L T V T E D L K N V  
TACGAGCAGTACTTCGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGAGGACCTGAAAAACGTT  
  
F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K  
TTCCCACCCGAGGTCGCTGTGTTGAACCATCAGAAGCAGAGATCTCCCACACCCAAAAG  
  
A T L V C L A T G F Y P D H V E L S W W  
GCCACACTGGTGTGCTGGCCACAGGCTTCTACCCCGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGG  
  
V N G K E V H S G V S T D P Q P L K E Q  
GTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACAGACCCGCAGCCCCTCAAGGAGCAG  
  
P A L N D S R Y S L S S R L R V S A T F  
CCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTCCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTC  
  
W Q N P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N  
TGSCAGAACCCCGCAACCACTCCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAAT

D E W T Q D R A K P V T Q I V S A E A W  
GACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCTGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTGG  
<TCR beta spojovník c-fos>  
G R A D P G G L T D T L Q A E T D Q L E  
GGTAGAGCAGACcccgggGGTCTGACTGATACACTCCAAGCGGAGACAGATCAACTTGAA  
  
D K K S A L Q T E I A N L L K E K E K L  
GACAAGAAGTCTGCGTTGCAGACCGAGATTGCCAATCTACTGAAAGAGAAGGAAAAACTA  
  
E F I L A A Y \*  
GAGTTCATCCTGGCAGCTTACTAG

Obr. 33 - pokračovanie

TCR beta>  
M V D G G I T Q S P K Y L F R K E G Q N  
ATGGTGGATGGTGGAAATCACTCAGTCCCCAAAGTACCTGTTCAGAAAGGAAGGACAGAAT  
  
V T L S C E Q N L N H D A M Y W Y R Q D  
GTGACCCTGAGTTGTGAACAGAATTTGAACCACGATGCCATGTACTGGTACCGACAGGAC  
  
P G Q G L R L I Y Y S Q I V N D F Q K G  
CCAGGGCAAGGGCTGAGATTGATCTACTACTCACAGATAGTAAATGACTTTCAGAAAGGA  
  
D I A E G Y S V S R E K K E S F P L T V  
GATATAGCTGAAGGGTACAGCGTCTCTCGGGAGAAGAAGGAATCCTTTCCTCTCACTGTG  
  
T S A Q K N P T A F Y L C A S S S R S S  
ACATCGGCCCAAAGAACCACGACGCTTCTATCTCTGTGCCAGTAGTTCGAGGAGCTCC  
  
Y E Q Y F G P G T R L T V T E D L K N V  
TACGAGCACTACTTCGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGAGGACCTGAAAAACGTT  
  
F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K  
TTCCCACCCGAGGTCGCTGTGTTGAACCATCAGAAGCAGAGATCTCCCACACCCAAAAG  
  
A T L V C L A T G F Y P D H V E L S W W  
GCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTACCCCGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGG  
  
V N G K E V H S G V S T D P Q P L K E Q  
GTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACAGACCCGCAGCCCCTCAAGGAGCAG  
  
P A L N D S R Y S L S S R L R V S A T F  
CCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTCCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTC  
  
W Q N P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N  
TGGCAGAACCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTCTACGGGCTCTCGGAGAAT

D E W T Q D R A K P V T Q I V S A E A W  
GACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCTGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTGG

<TCR beta spojovník c-fos>

G R A D P G G L T D T L Q A E T D Q L E  
GGTAGAGCAGACccccgggGGTCTGACTGATACACTCCAAGCGGAGACAGATCAACTTGAA

D K K S A L Q T E I A N L L K E K E K L  
GACAAGAAGTCTGCGTTGCAGACCCGAGATTGCCAATCTACTGAAAGAGAAGGAAAACTA

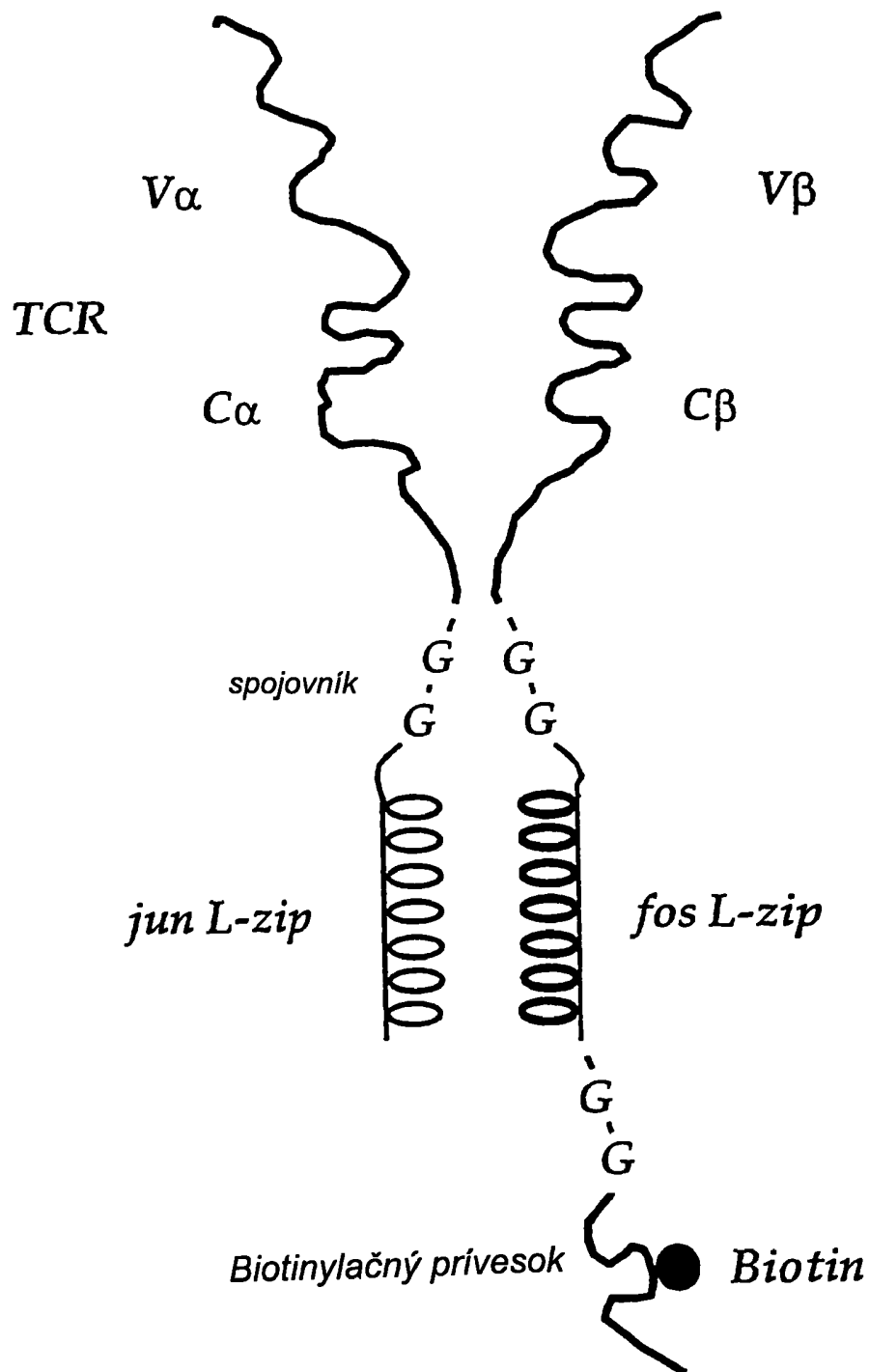
spojovník Biotinylačný privesok >

E F I L A A Y G S G G G L N D I F E A Q  
GAGTTCATCCTGGCAGCTTACggatccGGTGGTGGTCTGAACGATATTTTGAAGCTCAG

K I E W H \*

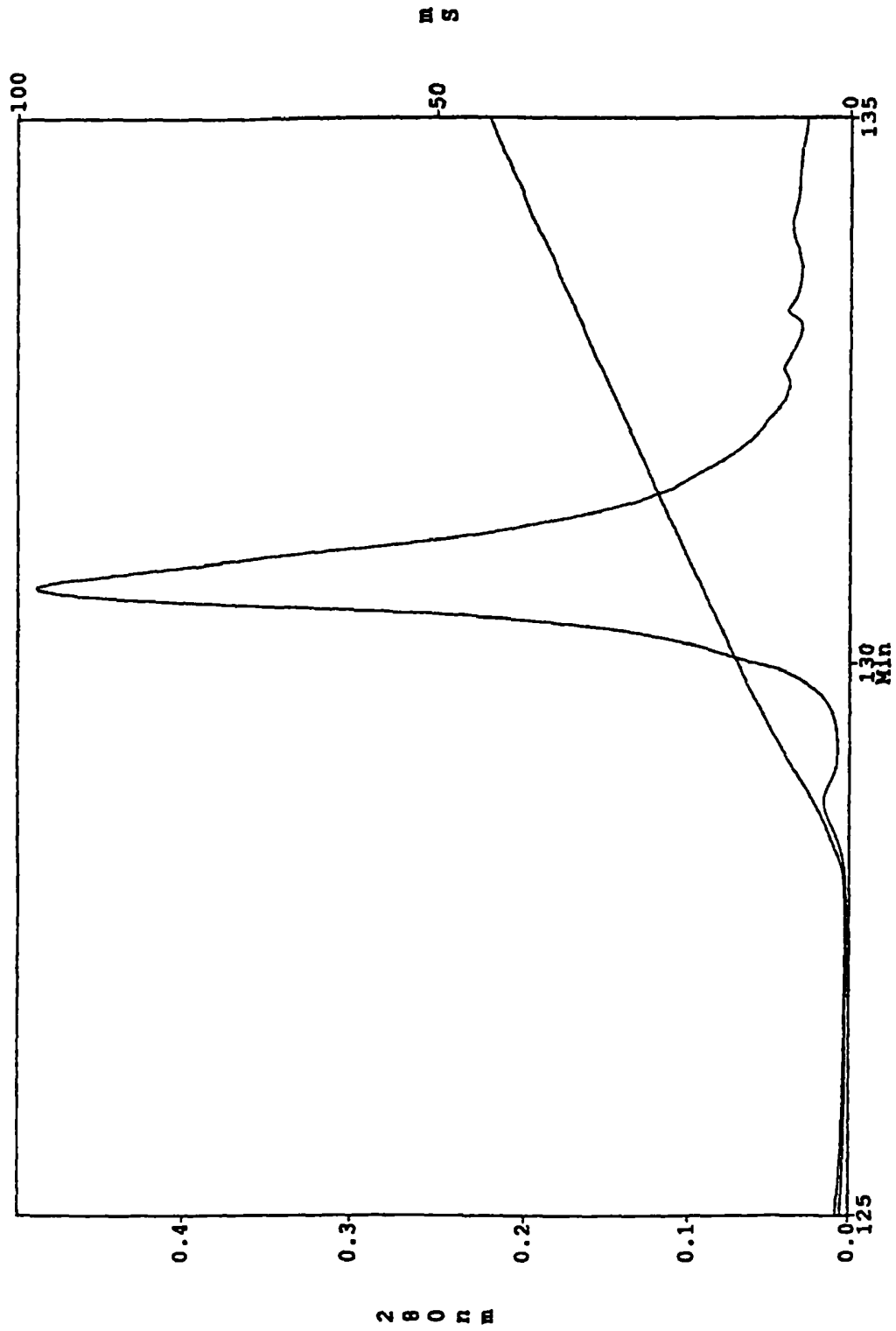
AAAATCGAATGGCATTAA

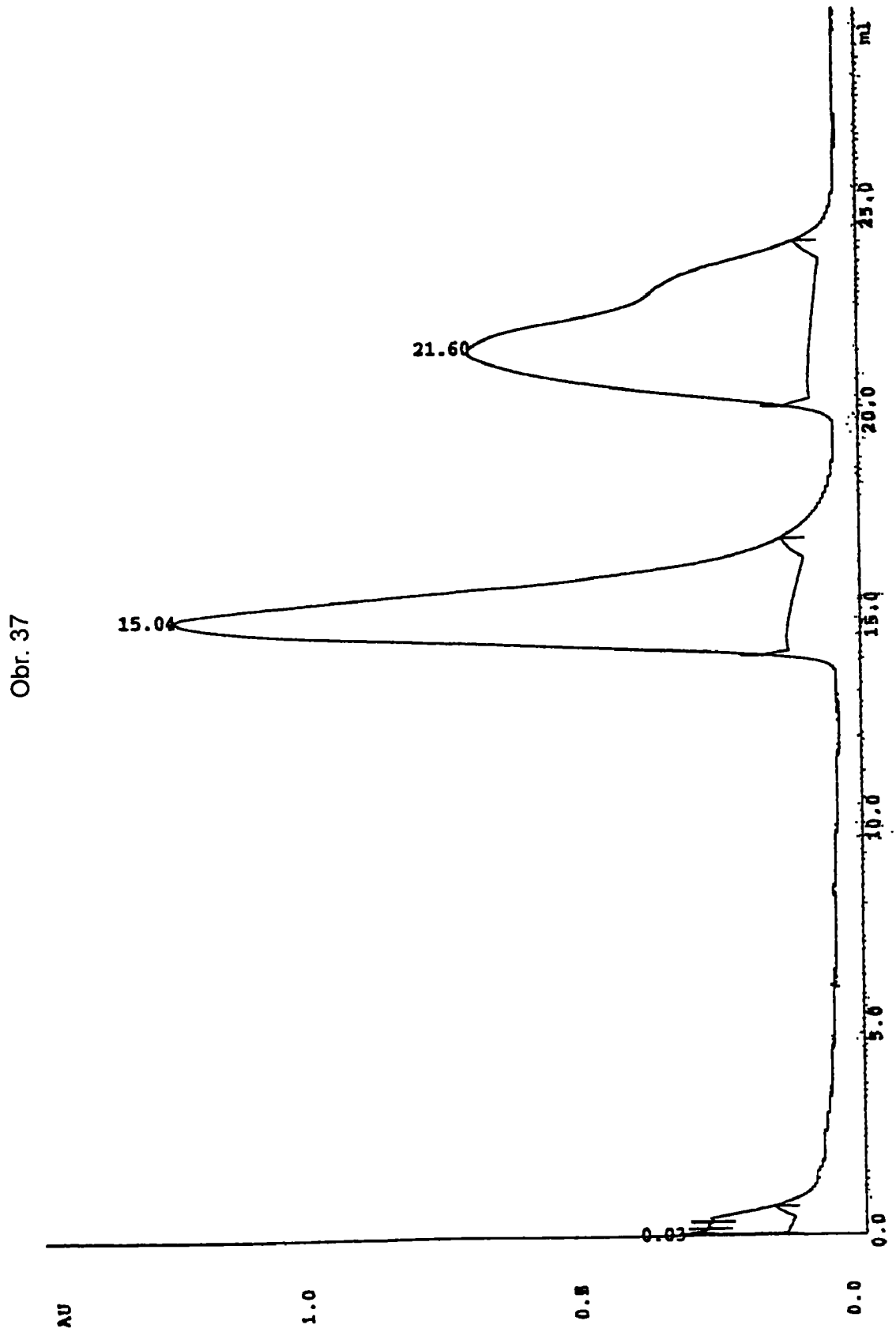
Obr. 34 - pokračovanie



Obr. 35

Obr. 36





TCR alfa>  
 M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A  
 atgCAGAAGGAAGTGGAGCAGAACTCTGGACCCCTCAGTGTTCAGAGGGAGCCATTGCC

S L N C T Y S D R G S Q S F F W Y R Q Y  
 TCTCTCAACTGCACTTACAGTGACCGAGGTTCCAGTCCTTCTTCTGGTACAGACAATAT

S G K S P E L I M S I Y S N G D K E D G  
 TCTGGAAAAGCCCTGAGTTGATAATGTCCATATACTCCAATGGTGACAAAGAAGATGGA

R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S  
 AGGTTTACAGCACAGCTCAATAAAGCCAGCCAGTATGTTTCTCTGCTCATCAGAGACTCC

Q P S D S A T Y L C A V T T D S W G K L  
 CAGCCCAGTGATTACAGCCACCTACCTCTGTGCCGTTACAACTGACAGCTGGGGGAAATTG

Q F G A G T Q V V V T P D I Q N P D P A  
 CAGTTTGGAGCAGGGACCCAGGTTGTGGTCACCCAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCC

V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T D F  
 GTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTACCCGATTTT

D S Q T N V S Q S K D S D V Y I T D K T  
 GATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAT

V L D M R S M D F K S N S A V A W S N K  
 GTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAA

S D F A C A N A F N N S I I P E D T F F  
 TCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTC

<TCR alfa spojovnik c-jun>  
 P S P E S S P G G R I A R L E E K V K T  
 CCCAGCCCAGAAAGTTCCccccgggGGTAGAATCGCCCGGCTGGAGGAAAAAGTGAAAACC

L K A Q N S E L A S T A N M L R E Q V A  
 TTGAAGCTCAGAACTCGGAGCTGGCGTCCACGGCCAACATGCTCAGGGAACAGGTGGCA

Q L K Q K V M N Y \*  
 CAGCTTAAACAGAAAGTCATGAACTACTAG

TCR beta>  
M N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M  
atgAACGCTGGTGTCACTCAGACCCCAAAATCCAGGTCCTGAAGACAGGACAGAGCATG

T L Q C A Q D M N H E Y M S W Y R Q D P  
AGACTGCAGTGTGCCAGGATATGAACCATGAATACATGTCCTGGTATCGACAAGACCCA

G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q G E  
GGCATGGGGCTGAGGCTGATTCATTACTCAGTTGGTGCTGGTATCACTGACCAAGGAGAA

V P N G Y N V S R S T T E D F P L R L L  
GTCCCAATGGCTACAATGTCTCCAGATCAACCACAGAGGATTTCCCGCTCAGGCTGCTG

S A A P S Q T S V Y F C A S R P G L A G  
TCGGCTGCTCCCTCCCAGACATCTGTGTACTTCTGTGCCAGCAGGCCGGGACTAGCGGGA

G R P E Q Y F G P G T R L T V T E D L K  
GGGCGACCAGAGCAGTACTTCGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGAGGACCTGAAA

N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T  
AACGTGTTCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACC

Q K A T L V C L A T G F Y P D H V E L S  
CAAAAGGCCACACTGGTGTGCTGGCCACAGGCTTCTACCCCGACCACGTGGAGCTGAGC

W W V N G K E V H S G V S T D P Q P L K  
TGGTGGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACAGACCCGCAGCCCCTCAAG

E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A  
GAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACgctCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCC

T F W Q N P R N H F R C Q V Q F Y G L S  
ACCTTCTGGCAGAACCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCG

E N D E W T Q D R A K P V T Q I V S A E  
GAGAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCTGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAG

<TCR beta spojovnik c-fos>  
A W G R A D P G G L T D T L Q A E T D Q  
GCCTGGGGTAGAGCAGACcccgggGGTCTGACTGATACACTCCAAGCGGAGACAGATCAA

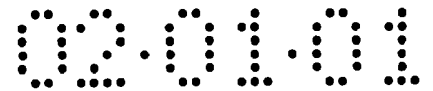
L E D K K S A L Q T E I A N L L K E K E  
CTTGAAGACAAGAAGTCTGCGTTGCAGACCGAGATTGCCAATCTACTGAAAGAGAAGGAA

spojovník Biotinyláčny privesok >

K L E F I L A A Y G S G G G L N D I F E  
AAACTAGAGTTCATCCTGGCAGCTTACggatccGGTGGTGGTCTGAACGATATTTTGA

A Q K I E W H \*  
GCTCAGAAAATCGAATGGCATTAAAGCTT

Obr. 39 - pokračovanie



TCR alfa>  
M Q Q K N D D Q Q V K Q N S P S L S V Q  
atgCAACAGAAGAATGATGACCAGCAAGTTAAGCAAATTCACCATCCCTGAGCGTCCAG

E G R I S I L N C D Y T N S M F D Y F L  
GAAGGAAGAATTTCTATTCTGAACTGTGACTATACTAACAGCATGTTTGATTATTTCTTA

W Y K K Y P A E G P T F L I S I S S I K  
TGGTACAAAATACCCCTGCTGAAGGTCTACATTCCTGATATCTATAAGTTCATTAAG

D K N E D G R E T V F L N K S A K H L S  
GATAAAAATGAAGATGGAAGATTCACTGTCTTCTTAAACAAAAGTGCCAAGCACCTCTCT

L H I V P S Q P G D S A V Y F C A A M E  
CTGCACATTGTGCCCTCCCAGCCTGGAGACTCTGCAGTGTACTTCTGTGCAGCAATGGAG

G A Q K L V F G Q G T R L T I N P N I Q  
GGAGCCCAGAAGCTGGTATTTGGCCAAGGAACCAGGCTGACTATCAACCCAAATATCCAG

N P D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C  
AACCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGC

L F T D F D S Q T N V S Q S K D S D V Y  
CTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTAT

I T D K T V L D M R S M D F K S N S A V  
ATCACAGACAAAATGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTG

A W S N K S D F A C A N A F N N S I I P  
GCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCA

<TCR alfa spojovnik c-jun>  
E D T F F P S P E S S P G G R I A R L E  
GAAGACACCTTCTTCCCAGCCCAGAAAGTTCCcccgggGGTAGAATCGCCCGCTGGAG

E K V K T L K A Q N S E L A S T A N M L  
GAAAAAGTGAAAACCTTGAAAGCTCAGAACTCGGAGCTGGCGTCCACGGCCAACATGCTC

R E Q V A Q L K Q K V M N Y \*  
AGGGAACAGGTGGCACAGCTTAAACAGAAAGTCATGAACTACTAG

## TCR beta&gt;

M N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M  
atgAACGCTGGTGTCACTCAGACCCCAAATTCAGGTCTGAAGACAGGACAGAGCATG

T L Q C A Q D M N H E Y M S W Y R Q D P  
ACACTGCAGTGTGCCAGGATATGAACCATGAATACATGTCTGGTATCGACAAGACCCA

G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q G E  
GGCATGGGGCTGAGGCTGATTCATTACTCAGTTGGTGTGGTATCACTGACCAAGGAGAA

V P N G Y N V S R S T T E D F P L R L L  
GTCCCAATGGCTACAATGTCTCCAGATCAACCACAGAGGATTTCCCGCTCAGGCTGCTG

S A A P S Q T S V Y F C A S S Y P G G G  
TCGGCTGCTCCCTCCCAAGACATCTGTGTACTTCTGTGCCAGCAGTTACCaGGaGGGGGGG

F Y E Q Y F G P G T R L T V T E D L K N  
TTTTACGAGCAGTACTTCGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGAGGACCTGAAAAAC

V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q  
GTGTCCCACCCGAGGTGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCCACACCCAA

K A T L V C L A T G F Y P D H V E L S W  
AAGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTACCCCGACCACGTGGAGCTGAGCTGG

W V N G K E V H S G V S T D P Q P L K E  
TGGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACAGACCCGAGCCCTCAAGGAG

Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T  
CAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACgctCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGCCACC

F W Q D P R N H F R C Q V Q F Y G L S E  
TTCTGGCAGgACCCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAG

N D E W T Q D R A K P V T Q I V S A E A  
AATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCC

## &lt;TCR beta spojovník c-fos&gt;

W G R A D P G G L T D T L Q A E T D Q L  
TGGGGTAGAGCAGACcccgggGGTCTGACTGATACACTCCAAGCGGAGACAGATCAACTT

E D K K S A L Q T E I A N L L K E K E K  
GAAGACAAGAAGTCTGCGTTGCAGACCGAGATTGCCAATCTACTGAAAGAGAAGGAAAA

spojovník Biotinylačný prívesok >

L E F I L A A Y G S G G G L N D I F E A  
CTAGAGTTCATCCTGGCAGCTTACggatccGGTGGTGGTCTGAACGATATTTTTGAAGCT

Q K I E W H \*  
CAGAAAATCGAATGGCATTAAAGCTT

Obr. 41 - pokračovanie