(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 692 33 652 T2** 2007.09.27

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 529 033 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **692 33 652.4**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR92/00111**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **92 905 817.0**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1992/013949**
(86) PCT-Anmeldetag: **07.02.1992**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **20.08.1992**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **03.03.1993**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **30.08.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **27.09.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/63*** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9101487	**08.02.1991**	**FR**
9104527	**12.04.1991**	**FR**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, MC, NL, SE

(73) Patentinhaber:
Aventis Pharma S.A., Antony, FR

(74) Vertreter:
derzeit kein Vertreter bestellt

(72) Erfinder:
HERCEND, Thierry, F-94130 Nogent-sur-Marne, FR; TRIEBEL, Frederic, F-92200 Neuilly-sur-Seine, FR; ROMAN-ROMAN, Sergio, F-75014 Paris, FR; FERRADINI, Laurent, F-75014 Paris, FR

(54) Bezeichnung: **NUKLEOTIDSEQUENZEN, DIE FÜR DIE VERÄNDERLICHEN BEREICHE DER ALPHA-KETTEN MENSCHLICHER T-ZELL-REZEPTOREN KODIEREN SOWIE IHRE VERWENDUNGEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine neue Nukleotidsequenz, die für eine variable Region der α-Kette menschlicher T-Zellen-Rezeptoren kodiert, die entsprechenden Peptidsegmente und die Anwendungen in Diagnose und Therapie.

[0002] Es ist bekannt, daß die Rezeptoren, die die Antigene an der Oberfläche der reifen T-Lymphozyten erkennen (im folgenden T-Zellen-Rezeptoren genannt) eine Struktur aufweisen, die eine gewisse Analogie mit der Struktur von Immunglobulinen aufweisen. So enthalten sie heterodimere Strukturen, die α- und β-Glykoproteinketten oder γ- und δ-Glycoproteinketten umfassen (siehe Meuer et al. (1), Moingeon et al. (2), Brenner et al. (3), Bank et al.(4)).

[0003] Die Reihe der T-Zellen-Rezeptoren muß der enormen Vielfältigkeit der antigenen Determinanten begegnen können. Dies geschieht durch genetische Rekombination der unterschiedlichen diskreten Abschnitte von Genen, die für die verschiedenen Strukturregionen der T-Zellen-Rezeptoren kodieren. So enthalten die Gene V-Abschnitte (Variable Abschnitte), gegebenenfalls D-Abschnitte (Diversity-Abschnitte), J-Regionen (Joining-Abschnitte) und C-Abschnitte (Konstante Abschnitte). Während der Differenzierung der T-Zellen werden spezifische Gene durch Rekombination der V-, D- und J-Abschnitte für die β- und δ-Loci und V-Abschnitte und J-Abschnitte für die α- und γ-Loci erzeugt. Diese spezifischen Kombinationen sowie die Paarung der beiden Ketten führen zu der Kombinationsvielfalt. Diese Vielfalt wird noch stark durch zwei Nebenmechanismen erweitert, nämlich der ungenauen Zusammenfügung der V-D-J-Abschnitte bzw. der V-J-Abschnitte und der Hinzufügung von Nukleotiden, die dem N-Abschnitt entsprechen (Davis et al. (5)).

[0004] Es ist bereits eine gewisse Anzahl von V-Gen-Abschnitten bekannt. Diese Abschnitte werden entsprechend der Ähnlichkeit der Sequenzen in Unterfamilien eingeteilt. Definitionsgemäß werden diejenigen Abschnitte, die mehr als 75% Ähnlichkeit in der Nukleotidsequenz aufweisen, als Mitglieder derselben Unterfamilie betrachtet (Crews et al. 6)). Die bekannten Vα-Gen-Abschnitte wurden dementsprechend in 22 Unterfamilien eingeteilt, von denen 14 nur ein einziges Mitglied aufwiesen (siehe Concannon et al. (7), Kimura et al. (8), Wilson et al. (9)).

[0005] Außerdem wurden ungefähr 60 Jα-Gen-Abschnitte beschrieben (9).

[0006] Außerdem wurden in jüngster Zeit in WO 90/06758 monoklonale Antikörper gegen spezifische Abschnitte der variablen Teile der T-Zellen-Rezeptoren, insbesondere die β- und δ-Ketten, beschrieben. Diese monoklonalen Antikörper eignen sich nicht nur als Werkzeuge für die Diagnose, sondern auch als Werkzeuge für die Therapie, zum Beispiel gegen rheumatoide Arthritis.

[0007] Die Verwendung von synthetischen Peptiden, die variablen Regionen der α- oder β-Ketten entsprechen, bei der Behandlung von Autoimmunkrankheiten ist ebenfalls beschrieben worden (23 und 24).

[0008] Außerdem ist bekannt, daß zwischen verschiedenen Individuen Variationen bezüglich der Expression von unterschiedlichen variablen Abschnitten des T-Rezeptors beim Menschen existieren (27 und 28).

[0009] Mit der vorliegenden Erfindung soll die Reihe der Genabschnitte, die für variable Regionen der α-Ketten der T-Zellen-Rezeptoren kodieren, erweitert werden, und zwar dadurch, daß man einen neuen Vα-Genabschnitt bereitstellt.

[0010] Die vorliegende Erfindung betrifft also eine Nukleotidsequenz, die für eine variable Region der α-Kette menschlicher T-Zellen-Rezeptoren kodiert und die einer cDNA entspricht, die die Nukleotidsequenz des Vα-Abschnitts gemäß SEQ ID Nr. 1 umfaßt sowie die Sequenzen, die sich davon durch ein oder mehrere Nukleotid(e) unterscheiden.

[0011] Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung insbesondere:

– eine Nukleotidsequenz, die für eine variable Region der α-Kette von menschlichen T-Lymphozyten-Rezeptoren kodiert und die der cDNA zu der gesamten Nukleotidsequenz des Abschnitts Vα oder einem Teil davon entspricht und die der Sequenz 1 bis 200 der SEQ ID Nr. 1 entspricht, sowie die Sequenzen, die sich davon durch ein oder zwei Nukleotide unterscheiden.

[0012] Unter "Nukleotidsequenzen, die cDNAs entsprechen, die den gesamten Nukleotidsequenzen oder einem Teil davon entsprechen" versteht man sowohl die vollständigen Sequenzen als auch Fragmente dieser

Sequenzen, darunter auch kurze Fragmente (Oligonukleotide), die als Sonden verwendet werden (und die im allgemeinen mindestens zehn Nukleotide aufweisen) oder die als Primer verwendet werden (und die im allgemeinen mindestens 15 Nukleotide aufweisen). Allgemein umfaßt die Erfindung die Gesamtheit der neuen Oligonukleotide, die erfindungsgemäß Fragmente der Sequenz Vα sind.

[0013] Die Sequenzen, die sich durch ein oder zwei Nukleotid(e) unterscheiden, entsprechen Variationen, die man bei einem Versuch bei der Bestimmung der Nukleotidsequenz von mehreren cDNAs beobachtet.

[0014] Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung die Peptide, die von den erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen sowie deren Allelen und Derivaten codiert werden und die dieselbe Funktion aufweisen.

[0015] Allgemein umfaßt die vorliegende Erfindung die Peptide, die aus einer Peptidsequenz, die von den erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen kodiert werden bzw. diese Nukleotidsequenz umfassen, bestehen sowie die Fragmente dieser Peptide. Außerdem umfaßt sie die Peptide, die sie von diesen durch eine oder mehrere Aminosäure(n) unterscheiden und die dieselbe Funktion aufweisen. Diese Peptide können Modifikationen entsprechen, wie sie bei den Muteinen oder bei Allelvariationen bekannt sind. Es wurde nämlich insbesondere gezeigt, daß bei gewissen Genabschnitten, die für variable Regionen der Ketten des T-Zellen-Rezeptors beim Menschen ein Phänomen eines genetischen Polymorphismus auftritt, der Allelvariation genannt wird (25). Die vorliegende Erfindung umfaßt die Peptide, die aufgrund dieses Phänomens auftreten.

[0016] Die erfindungsgemäße Nukleotidsequenz wurde mit den folgenden Schritten erhalten:
– Isolation von RNAs von peripheren Lymphozyten eines Einzelorganismus;
– Gewinnen der komplementären DNA mit Hilfe der reversen Transkriptase und einem für die Cα-Region spezifischen Primer A (SEQ ID Nr. 21);
– Genamplifikation (mittels Anchored Polymerase Chain Reaction bzw. A-PCR) mit Hilfe einer DNA-Polymerase, eines poly-C-Primers (SEQ ID Nr. 22) und einem für die Cα-Region spezifischen Primer B (SEQ ID Nr. 23);
– erneute Amplifikation mittels A-PCR mittels DNA-Polymerase und einem für die Cα-Region spezifischen Primer C (SEQ ID Nr. 24);
– Insertion in einen Plasmidvektor;
– Transformation eines bakteriellen Wirts mit dem rekombinanten Vektor;
– Durchmustern der rekombinanten Bakterienkolonien mit einem markierten für Cα spezifischen Oligonukleotid D (SEQ ID Nr. 25);
– Isolation von Plasmiden von positiven Kolonien;
– sowie Sequenzierung der DNA-Fragmente, die die Cα-Region enthalten.

[0017] Die vorliegende Erfindung kann insbesondere mittels bispezifischer Genamplifikation (Polymerase-Kettenreaktion bzw. PCR) nachgearbeitet werden, und zwar dadurch, daß man von den peripheren Lymphozyten, die die m-RNA mit dem variablen Abschnitt, der der Sequenz ID Nr. 1 der Erfindung entspricht, ausgeht oder auch daß man diese PCR-Technik auf genomische DNA von einer beliebigen somatischen Zelle eines zufällig gewählten Einzelorganismus anwendet. Die Erfindung kann auch dadurch nachgearbeitet werden, daß man die obige Gensequenz mittels chemischer Oligonukleotidsynthese herstellt.

[0018] Die erfindungsgemäßen Peptide können mittels der traditionellen Peptidsynthese erhalten werden. Sie können auch durch Anwendung von Techniken, die als Gentechnik bekannt sind, erhalten werden, wobei eine DNA-Sequenz, die für ein erfindungsgemäßes Peptid kodiert, in einen Expressionsvektor wie ein Plasmid insertiert wird und Zellen mit diesem Expressionsvektor transformiert werden.

[0019] Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch Plasmide und Expressionsvektoren mit einer DNA-Sequenz, die für ein erfindungsgemäßes Peptid kodiert, sowie mit diesem Vektor transformierte Werte.

[0020] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Antikörper, insbesondere monoklonale Antikörper, gegen eine antige Determinante, die zu einem erfindungsgemäßen Peptid gehört oder ein erfindungsgemäßes Peptid enthält.

[0021] Die monoklonalen Antikörper können auf jedem Weg erhalten werden, der es ermöglicht, ausgehend von Zellkulturlinien Antikörpermoleküle zu produzieren. Dazu zählen die unterschiedlichen Techniken, bei denen Hybridome verwendet werden.

[0022] Antikörper können beim Tier dadurch erzeugt werden, daß man Tiere dadurch immunisiert, daß man

ihnen erfindungsgemäße Peptide oder Fragmente injiziert, egal ob diese natürlich, rekombinant oder synthetisch sind, gegebenenfalls nach Kopplung mit einem immunogenen Agens wie dem Tetanus-Anatoxin, oder dadurch, daß man ihnen humane T-Lymphozyten injiziert, die an ihrer Oberfläche die entsprechenden Sequenzen exprimieren, darunter auch rekombinante Zellen, die mit den entsprechenden Kodiersequenzen transfiziert sind.

[0023] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Hybridome, die monoklonale Antikörper gegen die erfindungsgemäßen Polypeptide produzieren.

[0024] Die vorliegende Erfindung umfaßt auch die Fragmente und Derivate von erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpern, die mit den von den T-Zellen-Rezeptoren definierten variablen Regionen reagieren. Bei diesen Fragmenten handelt es sich insbesondere um die F(ab')2-Fragmente, die durch enzymatische Spaltung von Antikörpermolekülen mit Pepsin erhalten werden können, die Fab'-Fragmente, die durch Reduktion der Disulfidbrücken von F(ab')2-Fragmenten erhalten werden können, sowie die Fab'-Fragmente, die durch enzymatische Spaltung von Antikörpermolekülen mit Papain in Gegenwart eines Reduktionsmittels erhalten werden können. Diese Fragmente können auch gentechnisch erhalten werden.

[0025] Bei den Derivaten von monoklonalen Antikörpern handelt es sich zum Beispiel um Antikörper oder Fragmente dieser Antikörper, an die Marker wie ein Radioisotop gebunden sind. Die Derivate von monoklonalen Antikörpern sind auch Antikörper oder Fragmente dieser Antikörper, an die therapeutisch aktive Moleküle gebunden sind, insbesondere zytotoxische Verbindungen.

[0026] Die Produkte der Erfindung sind vielseitig auf dem Gebiet der Diagnose und auf dem Gebiet der Therapie einsetzbar.

1 – Einsatz auf dem Gebiet der Diagnose

[0027] Die in den erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen enthaltenen Oligonukleotide können für die Konstruktion von Nachweissonden (im allgemeinen mindestens 10 Nukleotide), die mit einer variablen Region der α-Kette hybridisieren können, oder die Konstruktion von Primern für die Amplifikation von DNA (die im allgemeinen mindestens 15 Nukleotide, vorzugsweise mindestens 17 Nukleotide enthalten), die sich an eine zu amplifizierende Sequenz anlagern können, verwendet werden.

[0028] Die Oligonukleotide lassen sich daher in der Diagnose vn Immunstörungen einsetzen, und zwar dadurch, daß das Vorhandensein von Nukleinsäuresequenzen, die mit einem Gen, das für variable Regionen von α-Ketten des T-Zellen-Rezeptors in der mRNA einer Probe eines Patienten kodieren, homolog sind, nachgewiesen werden. Um einen Zusammenhang zwischen der Expression von Genen von T-Zellen und einer Krankheit herzustellen, können unterschiedliche Verfahren verwendet werden. Zu diesen Verfahren zählen:

a – Herstellung und Analyse von cDNA-Expressionsbibliotheken, die von T-Zellen, die mit der Krankheit in Zusammenhang stehen, erhalten wurden, um die Frequenz der dominanten Gene zu bestimmen;

b – Analyse von Proben genomischer DNA mittels Southern-Blot, um festzustellen, ob genetische Polymorphismen oder Umordnungen von Genen, die für die Rezeptoren der T-Zellen kodieren, vorliegen;

c – Analyse von Proben dadurch, daß man cDNA gewinnt, diese mittels PCR amplifiziert und mit den markierten Sonden hybridisiert;

d – In-situ-Hybridisierung von T-Zellen ohne zuvorige Kultur der T-Zellen.

[0029] Die Primer lassen sich in PCR-Reaktionen in einem Verfahren, wie es unter c oben definiert ist, einsetzen.

[0030] Die monoklonalen Antikörper, die Fragmente oder die Derivate dieser erfindungsgemäßen Antikörper, insbesondere die Anti-Vα-Antikörper, können dazu verwendet werden, um Immunreaktionen des T-Typs zu untersuchen, zum Beispiel bei Autoimmunerkrankungen, bei Krebserkrankungen, bei Allergie, bei Transplantation und bei Infektionskrankheiten. Insbesondere kann die Gesamtheit der verschiedenen variablen α-Abschnitte des T-Rezeptors untersucht werden, egal, ob es sich um T-Zellen des Fluids oder der Bewegung handelt. Allgemein kann es sich bei dem verwendeten Verfahren um In-vitro- oder In-vivo-Verfahren handeln.

[0031] Bei den In-vitro-Verfahren kann es sich bei den verwendeten Proben um Proben von Körperflüssigkeiten oder um Gewebeproben handeln. Zu dem verwendeten Verfahren können insbesondere die Durchflußzytofluorimetrie für die Analyse der T-Lymphozyten des Bluts oder um Markierungen eines anatomisch-pathologischen Schnittpräparats mittels Immunperoxidase für die Untersuchung der Lymphozyten, die in die Gewebe

eindringen, gehören.

[0032] Bei den In-vivo-Verfahren werden die Antikörper, ihre Fragmente oder ihre Derivate auf den üblichen Wegen, zum Beispiel intravenös, verabreicht, und man weist die immunspezifischen Bindungen nach. Dies kann zum Beispiel dann erhalten werden, wenn man einen mit einem Radioisotop markierten Antikörper verwendet.

2 – Einsatz auf dem Gebiet der Therapie

[0033] Die in den erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen enthaltenen Oligonukleotide können als antisense-Oligonukleotide in der Therapie verwendet werden. Man weiß nämlich, daß die Expression eines in Human-Lymphozyten transkribierten Gens in vitro inhibiert werden kann, und zwar dadurch, daß man diese Lymphozyten mit einem für das jeweilige Gen spezifischen antisense-Oligonukleotid inkubiert (26). Diese antisense-Oligonukleotide enthalten im allgemeinen mindestens zehn, vorzugsweise mindestens 16, Nukleotide. Bei diesen antisense-Oligonukleotiden kann es sich insbesondere um die invertierten und komplementierten Sequenzen handeln, die den 20 Nukleotiden stromaufwärts der Translationsinitiationsstelle (ATG) entsprechen. Das Ziel einer In-vitro-Verwendung von für einen Vα-Genabschnitt spezifischen antisense-Oligonukleotiden besteht darin, die Expression eines T-Rezeptors, der diesen Vα-Abschnitt enthält, zu stoppen (oder stark zu verringern) und so zu einer klonmäßigen Deletionserscheinung bezüglich der spezifischen Reaktivität der T-Lymphozyten zu gelangen. Die antisense-Oligonukleotide können nicht nur in vitro bei Human-T-Lymphozyten, die anschließend erneut injiziert werden, angewendet werden, sondern auch in vivo durch lokale oder systemische Injektion, vorzugsweise nach Modifikationen, um die In-vivo-Stabilität und das Eindringen dieser Oligonukleotide in das Innere der T-Lymphozyten zu erhöhen.

[0034] Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper, insbesondere die Anti-Vα-Antikörper, können zur Modulation des Immunsystems verwendet werden. Die Antikörper können zum Beispiel zur Blockierung der Wechselwirkung der Effektor-T-Zellen mit ihrem spezifischen Antigen verabreicht werden. Man kann auch Anti-T-Rezeptor-Antikörper, die zum Beispiel an ein zytotoxisches Molekül oder an ein Radioisotop gebunden sind, dazu verabreichen, um zu einer klonmäßigen Deletion zu gelangen, und zwar dadurch, daß eine spezifische Fixierung auf einer α-Kette eines T-Zellen-Rezeptors erfolgt. Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper können in schwach nitrogenen Konzentrationen in der Therapie verwendet werden, um spezifisch gewisse Untereinheiten der T-Zellen zu aktivieren, oder sie können in wesentlich höheren Konzentrationen verwendet werden, um sich an die entsprechenden Rezeptoren fix anzulagern und so diese Untereinheiten so zu markieren, daß sie vom Retikulo-endothelial-System eliminiert werden können. Ein wichtiges Kriterium für die Behandlung einer Krankheit ist die Fähigkeit, Untereinheiten der T-Zellen, die mit einer Krankheit in Zusammenhang stehen, zu modulieren. Details solch einer therapeutischen Modulation, nämlich eine Blockierung oder Unterdrückung einer bestimmten Untereinheit der T-Zellen oder umgekehrt die Stimulation und Aktivierung einer bestimmten Untereinheit, wird von der betreffenden Krankheit und von der jeweiligen Untereinheit der entsprechenden T-Zellen abhängen.

[0035] Im Vergleich zu derzeit vorgenommenen Behandlungen, bei denen Antikörper verwendet werden, wie die Behandlung von Patienten mit Nierentransplantation, bei denen ein Abstoßungsproblem auftritt, mit Anti-CD3-Antikörpern weist die oben beschriebene Art der Behandlung einen Vorteil auf, da aufgrund der Erfindung keine Modulation der Gesamtheit der T-Zellen-Population, sondern nur von der Untereinheit der T-Zellen, die die jeweilige α-Unterfamilie der T-Zellen-Rezeptoren, exprimieren, erfolgt.

[0036] Da die Reaktion der T-Zellen häufig oligoklonal ist, werden im allgemeinen zweckmäßig Cocktails aus mehreren Antikörpern in der Therapie verwendet.

[0037] Außerdem kann man die Anti-Vα-Antikörper dazu verwenden, um eine In-vitro-Selektion der T-Lymphozyten vorzunehmen, zum Beispiel dadurch, daß man sie auf eine Säule, die Kügelchen mit Antikörpern enthält, aufträgt. Diese Trennung von gewissen T-Lymphozyten kann im Hinblick auf eine Kultivierung dieser Lymphozyten vor ihrer Rückinjektion in den Patienten verwendet werden.

[0038] Außerdem kann man die erfindungsgemäßen Peptidsequenzen ganz oder teilweise in der Therapie verwenden, zum Beispiel die von den erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen kodierten Peptidsequenzen oder die Fragmente dieser Sequenzen, die im allgemeinen wenigsten acht bis zehn Aminosäuren enthalten). Diese Sequenzen bzw. Fragmente, die dem Menschen oder dem Tier verabreicht werden, können als Köder wirken, das heißt sie werden sich an das von dem schädlichen Antigen getragene Epitop anlagern und die Reaktion der normalen T-Zellen mit dem Antigen verhindern, wodurch sie die Entwicklung einer aggressiven

Krankheit gegen die Determinanten desselben verhindern. Sie können auch als Immunogene bei der Herstellung von Impfstoffen verwendet werden (gegebenenfalls nach Kopplung mit Trägerproteinen).

[0039] Im folgenden wird die vorliegende Erfindung anhand der beigelegten Abbildungen genauer beschrieben. Die Abbildungen zeigen folgendes:

[0040] Abb. 1A bis E zeigen ein Alignment einer bekannten Vα-Sequenz und einer Partialsequenz einer erfindungsgemäßen Extension für die Sequenz SEQ ID Nr. 6 bis 10, mit der Bezeichnung IGRa 08 bis IGRa 12. In diesen Abbildungen beginnt die Numerierung der Nukleotide beim ATG-Initiationscodon (das unterstrichen ist). Die Punkte geben die identischen Nukleotide an. Die Sequenzen, bei denen es sich um Leitsequenzen handeln soll, sind oberhalb mit einem Strich versehen.

[0041] Fig. 2 zeigt ein Alignment der neuen Jα-Sequenzen (SEQ ID Nr. 12, 13 und 15 bis 20) mit der Bezeichnung IGRJa 01, 02 und 04 bis 09. In diesen Sequenzen sind die Rekombinationssignale der Keimlinie unterstrichen. Die den stark konservierten Codons entsprechenden Aminosäuren sind oberhalb der Sequenzen gekennzeichnet. Die Codons, die einer Substitution in einer Position einer konservierten Aminosäure entsprechen, sind doppelt unterstrichen.

[0042] Abb. 3 zeigt die Southern-Blot-Analysen der mit einem Restriktionsenzym behandelten genomischen DNA, wobei man für die Sequenzen SEQ ID Nr. 1 bis 5 spezifische Sonden verwendete. Bei den verwendeten Restriktionsenzymen handelt es sich um EcoRI (Bahn R), HindIII (Bahn H) sowie BamIII (Bahn B). In dieser Abbildung zeigen die Dreiecke die Lage der DNA-Fragmente, die spezifisch mit Cα hybridisieren.

[0043] Fig. 4 ist eine Darstellung des autoradiographischen Nachweises der amplifizierten Transkripte der α-Ketten des von den peripheren Lymphozyten eines gesunden Probanden exprimierten PCR sowie der gemeinsam amplifizierten β-Akti-Kontrolle.

I – Herstellung von cDNA und Amplifikation mittels PCR

[0044] Als RNA-Ausgangsmaterial wurden periphere Lymphozyten eines Probanden verwendet. Die Gesamt-RNA wurde nach der Guanidiniumisothiocyanat-Cäsiumchlorid-Methode (Chirgwin (10)) oder nach der Ein-Schritt-Methode durch Extraktion mit Guanidiniumisothiocyanat, Phenol und Chloroform (Chomczynski(11)) erzeugt.

[0045] Der cDNA-Erststrang wird in einem Endvolumen von 50 Mikrolitern bei einer Temperatur von 42°C während einer Stunde synthetisiert, wobei 5 Mikrogramm Gesamt-RNA, die reverse Transkriptase sowie ein für die Cα-Region spezifischer Primer A, der aus der Sequenz 5'-GTTGCTCCAGGCCACAGCACTG (SEQ ID Nr. 21) besteht. Dieses Material wurde anschließend durch Extraktion mit Phenol/Chloroform und Fällung mit Ammoniumacetat aufgereinigt. Nach Auswahl einer 0,45/1-kB-Fraktion auf Agarosegel wird 30 Minuten lang bei 37°C an den RNA/cDNA-Heteroduplex in einem $CoCl_2$-Zugabepuffer mit 14 Einheiten terminaler Desoxynukleotidyltransferase (Tdt) ein dG-Ende angefügt. Die Reaktion wurde durch zehnminütiges Halten bei 70°C gestoppt. Es wird mit 1 N NaOH (1/3 Volumen) versetzt und der Ansatz wurde eine Stunde lang bei 50°C inkubiert, um die RNA zu hydrolysieren, und anschließend mit 2 M Tris-HCl pH 8 und 1 N HCl neutralisiert. Nach Extraktion mit einer Phenol-Chloroform-Mischung wurde der cDNA-Erststrang mit G-Ende mittels Ethanol gefällt und damit eine Amplifikation durchgeführt, wobei man die PCR-Technik (Polymerase-Kettenreaktion gemäß Saiki et al. (12)) in einem Endvolumen von 100 Mikrolitern mit 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl pH 8,3, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,1% (Gew./Vol.) Gelatine, 200 Mikromol dNTP, 2,5 Einheiten Taq-Polymerase und 100 Pikomol der beiden Primer durchgeführt. Bei den zwei verwendeten Primern handelt es sich einerseits um einen poly-C-Primer (5'-GCATGCGCGCGG CCGCGGAGG-14C) (SEQ ID Nr. 22) gemäß Loh et al. (13) sowie zweitens um einen für die Cα-Region spezifischen Primer B (5'-GTCCATAGACCTC ATGTCCAGCACAG) (SEQ ID Nr. 23).

[0046] Es werden 25 Amplifikationszyklen und anschließend eine 15minütige abschließende Elongation bei 72°C durchgeführt. Jeder Zyklus umfaßt eine einminütige Denaturierung bei 92°C, eine zweiminütige Hybridisierung bei 55°C und eine vierminütige Elongationsdauer bei 72°C. Die Amplifikationsprodukte werden anschließend mit Ethanol gefällt, in 30 mM Natriumacetat pH 5, 50 mM NaCl, 1 mM $ZnCl_2$, 5 Vol.-% Glycerin suspendiert, und 1/10 dieses Materials wird größenmäßig auf einem einprozentigen Low-Melting-Agarosegel aufgereinigt.

[0047] Anschließend wird eine zweite Amplifikationsphase durchgeführt, und zwar direkt mit ungefähr 10% der Bande, die die Agarose enthält, wobei unter denselben Bedingungen wie zuvor vorgegangen wird, nur daß

man als für den für die Cα-Region spezifischen Primer C den Primer 5'-ATACACATCAGAATTC TTACTTTG (SEQ ID Nr. 24) verwendet. Der Reaktionsansatz wird anschließend mit Ethanol gefällt und das Fällungsprodukt wird in 60 µl H_2O suspendiert.

II – Klonierung und Sequenzierung der cDNAs

[0048] 1/3 des Produkts der zweiten Amplifikation wird mit SacII verdaut, auf einprozentigem Agarosegel getrennt und durch Adsorption an Glaskügelchen auf gereinigt. Das Material wird in den Vektor Bluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, USA) insertiert und mit den erhaltenen Rekombinanten werden XL1-Blau-Stämme von E. coli (Stratagene) transformiert. Nach Auftragen in Gegenwart von X-gal und IPTG wird mit den weißen Kolonien ein Test durchgeführt, wobei man eine "Dot-Blot"-Technik verwendet und als Sonde ein mit 32 P markiertes, für die Cα-Region (5'-GTCACTGG ATTTAGAGTCT) (SEQ ID Nr. 25) spezifisches drittes Oligonukleotid einsetzt. Von positiven Kolonien wird die Plasmid-DNA extrahiert und man sequenziert die beiden Stränge mit dem Didesoxy-Kettenabbruchverfahren (Sanger et al. (14)) mit Sequenaee 2,0 (United States Biochemicals, Cleveland, USA), wobei nach den Empfehlungen des Zulieferers vorgegangen wird. Außer bei der Sequenz SEQ ID Nr. 5 wurden alle Nukleotidsequenzen an den beiden Strängen bestimmt, und zwar mit mindestens zwei unterschiedlichen cDNA-Klonen.

[0049] Die erhaltenen Sequenzen werden mit dem von Lipman und Pearson (15) entwickelten Verfahren mit den veröffentlichen Vα- und Jα-Sequenzen verglichen. Die mutmaßlichen Ausgangscodons wurden dadurch identifiziert, daß man nach dem Vorhandensein der Kosak-Konsensussequenz für die Translationsinitiationsstellen in eukaryontischen Zellen suchte (Kozak (16)). Das Vorhandensein von hydrophoben Leitsequenzen des N-terminalen Endes wurde mittels Hydrophobizitätsanalyse gemäß dem von Kyte (17) beschriebenen Verfahren nachgewiesen.

III – Southern-Blot-Analyse

[0050] Die DNA der Human-Erythroleukämie-Zellinie K562 wurde extrahiert und mit einem der folgenden Restriktionsenzyme verdaut: EcoR I, BamH I bzw. Hind III. Mit der DNA (15 Mikrogramm) wurde eine Elektrophorese auf 0,7%iger Agarose durchgeführt und die DNA wurde wie von Triebel et al. (18) beschrieben auf Nylonmembranen übertragen. Die Hybridisierungen wurden 16 Stunden lang bei 65°C mit 6 × SSC, 0,5% SDS, 5 × Denhardt's und 100 Mikrogramm denaturierter Lachssperma-DNA durchgeführt. Die Membranen wurden bei 65°C mit 2 × SSC, 0,2% SDS gewaschen.

[0051] Als Vα-spezifische Sonden wurden Sonden verwendet, die durch Amplifikation von V-J-C-cDNA (500 Bp) mit Vα-Fragmenten, die den Sequenzen SEQ ID Nr. 1 bis 5 entsprechen, erhalten wurden, wobei als Primer der poly-C-Primer und der Primer C verwendet wurden. Die Sonden wurden auf einprozentigem Agarosegel gereinigt. Ausgehend von Fragmenten, die nach der Methode von Feinberg (19) auf Agarose aufgereinigt worden waren, wurden 32P-markierte DNA-Sonden hergestellt.

IV – Ergebnisse

[0052] Mit der A-PCR-Methode wurden 308 cDNAs, die mit der Cα-Sonde hybridisieren, kloniert und anschließend sequenziert. Darunter entsprechen 172 cDNAs einmalig auftretenden variablen V-J-Cα-Regionen.

[0053] Die beschriebenen Sequenzen Vα und Jα sind in der Aufzählung der Sequenzen angegeben, und zwar jeweils unter den Sequenzen SEQ ID Nr. 1 bis 11 sowie SEQ ID Nr. 12, 13 und 15 bis 20. Die Sequenzen SEQ ID Nr. 2-5 entsprechen neuen Unterfamilien (mit der Bezeichnung Vα25, Vα26, Vα27 bzw. Vα29, während die Sequenzen SEQ ID Nr. 1 und 6 bis 11 Verlängerungen von bekannten Vα-Abschnitten entsprechen.

1. Vα-Sequenzen, die neuen Unterfamilien entsprechen

[0054] Zur Identifikation der Anzahl der Vα-Gensegmente, die zu jeder Familie gehören, und zur Charakterisierung von DNA-Restriktionsfragmenten mit diesen Vα-Genabschnitten wurden Southern-Blot-Analysen von DNA der Keimbahn, die mit einer Endonuklease verdaut worden war, unter Verwendung der V-J-Cα-Sonden, die Vα-Fragmente enthalten, die den Sequenzen SEQ ID Nr. 2 bis 5 entsprechen, unter Hybridisierungsbedingungen mit niedriger Stringenz durchgeführt. Repräsentative Ergebnisse sind in **Abb. 3** dargestellt.

[0055] Diese Analysen zeigen, daß die Unterfamilie, die der SEQ ID Nr. 3 entspricht, mindestens zwei Genabschnitte umfaßt, während die anderen Sequenzen (SEQ ID Nr. 2, Nr. 4 und Nr. 5) vermutlich einmalig auf-

tretenden Mitgliedern entsprechen.

[0056] Die Restriktionsfragmente der Keimbahn-DNA weisen die folgende Größe auf:
SEQ ID Nr. 2 : EcoR I 2,2 kB, Hind III 4,8 und 5,7 kB, BamH I 25 kB
SEQ ID Nr. 3 : EcoR I 4,6 und 7,5 kB, Hind III 4,2 und 6,4 kB, BamH I 23 und 4,5 kB
SEQ ID Nr. 4 : EcoR I 7, 6 kB, Hind III 18 kB, BamH I 9 und 0, 9 kB
SEQ ID Nr. 5 : EcoR I 5,9 und 4,8 kB, Hind III 6,6 kB, BamH I 6,5 kB.

2. Sequenzen, die Verlängerungen von bekannten Vα-Sequenzen entsprechen

[0057] SEQ ID Nr. 1 (IGR a 02) entspricht einer Verlängerung des 5'-Endes der Sequenz LINV (171 Bp)(Mengle-Gaw (20)): diese Sequenz definiert die Unterfamilie mit der provisorischen Bezeichnung Vα w24.

[0058] SEQ ID Nr. 6 (IGR a 08): diese Sequenz entspricht einer Verlängerung des 5'-Endes der Sequenz des Klons Vα1 AE11 (Klein et al. (21)). Die beiden Sequenzen mit Alignment sind in **Abb. 1A** dargestellt.

[0059] SEQ ID Nr. 7 (IGR a 09): diese Sequenz entspricht einer Verlängerung, die für das NH_2-terminale Ende der Sequenz Vα2 AF110 (Klein, Zitat oben) kodiert. Die beiden Sequenzen mit Alignment sind in **Abb. 1B** dargestellt. Die Sequenz ID Nr. 7 entspricht einer Konsensussequenz. Man beobachtet, daß in Position 206 T statt C steht.

[0060] SEQ ID Nr. 8 (IGA a 010): diese Sequenz entspricht einer Verlängerung der 5'-Region des Klons Vα HAP35 (Yoshikai (22)). Die beiden Sequenzen mit Alignment sind in **Abb. 1C** dargestellt. Die Sequenz ID Nr. 8 entspricht einer Konsensussequenz. Man beobachtet, daß in Position 307 G statt A steht und daß in Position 360 T statt C steht.

[0061] SEQ ID Nr. 9 (IGA a 11): diese Sequenz entspricht einer Verlängerung des 3'-Endes der Sequenz Vα7 HAP12 (Yoshikai, Zitat oben). Das Alignment der Sequenzen ist in **Abb. 1D** dargestellt. Die Sequenz ID Nr. 9 entspricht einer Konsensussequenz. Man beobachtet, daß in Position 68 C statt T steht.

[0062] SEQ ID Nr. 10 (IGA a 12): diese Sequenz umfaßt die vollständige Kodieregion eines Gens der Unterfamilie Vα22, die bereits aufgrund der Partialsequenz (113 Bp) AC9 (Klein, Zitat oben) identifiziert worden ist. Die beiden Sequenzen mit Alignment sind in **Abb. 1E** dargestellt.

[0063] SEQ ID Nr. 11 (IGA a 13): diese Sequenz entspricht teilweise den Klonen HAVT 32 und HAVT 35 (die zur Unterfamilie Vα16 (8) gehören und die als Pseudogene beschrieben worden sind. Aufgrund der Hinzufügung eines Nukleotids in Position 108 kodiert die SEQ ID Nr. 11 nämlich für eine ursprüngliche variable Region eines T-Lymphozyten-Rezeptors. Außerdem ist diese Sequenz bezüglich des kodierenden Abschnitts mit einer Sequenz HSTCAYM (Klein et al. (21)) homolog. Die Sequenz SEQ ID Nr. 11 ist jedenfalls die einzige Sequenz, die vollständig und kodierend ist.

3. Jα-Sequenzen

[0064] In **Abb. 2** sind alle neuen Sequenzen Jα dargestellt. Der Großteil der acht Jα-Abschnitte weist eine stark konservierte Aminosäuresequenz FGXGT der Jα-Abschnitte auf, wie dies bei Yoshikai (Zitat oben) beschrieben ist. Bei dem Abschnitt IGRJa 07 ist jedoch der Threoninrest durch einen Isoleucinrest ersetzt.

[0065] Außerdem findet sich in IGRJa 02G statt dem Phenylalaninrest ein Cysteinrest.

[0066] Oligonukleotide, die für verschiedene Vα-Unterfamilien spezifisch sind, lassen sich als Primer für die Amplifikation von DNA, die diesen verschiedenen Vα-Unterfamilien entspricht, verwenden, zum Beispiel für eine Expressionsstufe von gewissen Vα-Unterfamilien bei einem Patienten und schließlich für ein Diagnostikum von Immunstörungen, wie dies weiter oben beschrieben ist.

[0067] Die vorherrschende Expression von gewissen Unterfamilien von Vα wurde bereits mit Hilfe eines unvollständigen Oligonukleotidsatzes untersucht. So haben Nitta et al. (29) die vorherrschende Expression der Vα-7-Gene in den Lymphozyten, die in Tumore eindringen, beschrieben. Außerdem haben Sottini et al. (30) die Untersuchung der Vα-Reihe bei Patienten mit rheumatoider Arthritis beschrieben.

[0068] Es wird ein vollständiger Satz von Oligonukleotiden beschrieben, die ganz spezifisch für jede Unterfa-

milie sind und mit denen gleichzeitig bekannte Vα-Unterfamilien und neue Vα-Unterfamilien untersucht werden können. Es wurden also zu diesem Zweck Oligonukleotide gewählt und synthetisiert und gegebenenfalls wurden Modifikationen von einem oder zwei Nukleotiden im Vergleich zu den natürlichen Sequenzen eingeführt, um Kreuzreaktivitäten zwischen den Unterfamilien zu verringern.

[0069] Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch die Verwendung eines Oligonukleotids der Sequenz SEQ ID Nr. 49 als Primer für die Amplifikation von DNA, die einer variablen Region der α-Kette von T-Zellen-Rezeptoren entspricht. Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung eines Oligonukleotids der Sequenz SEQ ID Nr. 49 als Primer für die Amplifikation von DNA, die einer variablen Region der α-Kette von T-Zellen-Rezeptoren entspricht.

[0070] Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zum Nachweis von Nukleotidsequenzen, die für Vα-Abschnitte von T-Rezeptoren kodieren, oder von cDNA, die deren Transkriptionsprodukten entsprechen, in einer biologischen Probe, dadurch gekennzeichnet, daß es die folgenden Schritte umfaßt:

a) Amplifikation der DNA mit mindestens einem Primer-Paar, das von dem Oligonukleotid der Sequenz SEQ ID Nr. 49 und einem Oligonukleotid, das zu dem Cα-Abschnitt gehört, gebildet wird, sowie

b) Nachweisen der amplifizierten Sequenzen mit einer Cα-Sonde.

[0071] Das Oligonukleotid, das zu dem Cα-Abschnitt gehört, der für die Amplifikation verwendet wird, kann insbesondere unter den Sequenzen SEQ ID Nr. 55 und 56 gewählt sein.

[0072] Um die Amplifikationseffizienz zu überprüfen, arbeitet man vorzugsweise in Gegenwart eines Kontroll-Primer-Paars und weist die amplifizierte entsprechende Kontrollsequenz mit Hilfe einer entsprechenden Kontrollsonde nach.

[0073] Dieses Kontroll-Primer-Paar kann zwei Cβ-Abschnitten entsprechen, zum Beispiel entsprechen die Primer CβF und CβK den Sequenzen SEQ ID Nr. 61 und 62. Man verwendet also eine Cβ-Nachweissonde (die zum Beispiel der Sequenz SEQ ID Nr. 63 entspricht). Das Primer-Paar kann jedoch auch aus zwei Primern, die zum β-Actin gehören, gebildet werden, insbesondere den Primern, die den Sequenzen SEQ ID Nr. 58 und 59 entsprechen. Man verwendet in diesem Fall eine Nachweissonde, die einer β-Actin-Sequenz entspricht, wie die Sequenz SEQ ID Nr. 60.

[0074] Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Diagnose-Kit zur Durchführung des oben genannten Verfahrens, das

a) mindestens ein Oligonukleotid der Sequenz SEQ ID Nr. 49,

b) einen Cα-Primer,

c) eine Cα-Sonde

umfaßt.

[0075] Solch ein Kit enthält vorzugsweise weiterhin

d) ein Kontroll-Primer-Paar,

e) eine Kontrollsonde.

[0076] In der Information, die in der Sequenzbeschreibung für die Sequenzen 26 bis 60 angegeben ist, entsprechen die Sequenzen SEQ ID Nr. 26 bis 47 Sequenzen, die zu Klonen der bekannten Unterfamilien Vα1 bis Vα22 gehören (und die von der EMBL-Datei abgerufen werden können) oder Sequenzen, die sich davon durch ein oder zwei Nukleotide unterscheiden.

[0077] Die Sequenzen SEQ ID Nr. 49, 50, 51, 52 und 54 entsprechen Sequenzen, die Klonen von neuen erfindungsgemäßen Unterfamilien gehören und die Unterfamilien mit der provisorischen Bezeichnung Vα w24, Vα w25, Vα w26, Vα w27 und Vα w29 entsprechen (wobei w bedeutet, daß noch keine definitive Bezeichnung erfolgt ist).

[0078] Die Sequenzen SEQ ID Nr. 48 und 53 entsprechen Sequenzen, die zu den Klonen IGRa01 bzw. IGRa06 von bekannten Unterfamilien gehören, bei denen jedoch noch keine definitive Bezeichnung erfolgt ist (Vα w23 bzw. Vα w28) und von denen ein Mitgliedselement bereits beschrieben worden ist (Hinkkanen A. et al. (31) bzw. Bernard O. et al. (32)). Die vollständige Sequenz von IGRa06 ist noch nicht veröffentlicht worden.

[0079] Die Sequenzen SEQ ID Nr. 55 und 56 sind zwei Beispiele für Oligonukleotide, die als Cα-Primer für

die Amplifikation verwendet werden können.

[0080] Die Sequenzen SEQ ID Nr. 57 ist Sequenz einer Cα-Sonde, die für den Nachweis von amplifizierter DNA verwendet werden kann.

[0081] Die Sequenzen SEQ ID Nr. 58, 59 und 60 sind jeweils Sequenzen eines Paars von Oligonukleotiden, die zur β-Actin-Sequenz gehören und die für die Überprüfung der Amplifikation verwendet werden können bzw. die Sequenz einer Sonde zum Nachweisen der entsprechenden amplifizierten DNAs.

[0082] In der Sequenzbeschreibung ist die angegebene Position die Position des 5'-Endes, die von der vorhersagbaren ATG-Translationsinitiationsstelle zu zählen ist. Bei unvollständigen Sequenzen (unbekannte 5'-Region) wird die Position (die mit einem Sternchen bezeichnet ist) in Bezug auf das erste Nukleotid der Sequenz angegeben. Die unterstrichenen Nukleotide entsprechen Fehlpaarungen, die in Bezug auf die natürliche Sequenz eingeführt wurden.

[0083] Die Oligonukleotide wurden auf einem automatischen DNA-Synthesegerät von Applied Biosystems, Typ 381 A, unter Verwendung der β-Cyanoethylphosphoramidit-Methode (Sinha et al. (33)) synthetisiert, wobei man gemäß der empfohlenen Vorschrift des Herstellers vorging. Die Oligonukleotide wurden in dem Gerät enttrityliert, vom Träger abgespalten und mit Ammoniak entschützt (60°C, fünf Stunden lang). Die Rohprodukte wurden mittels Umkehrphasen-Hochdruckchromatographie auf einer µ-Bondapak C-18-Säule gereinigt, wobei man einen Gradienten von Acetonitril (9 bis 15%) in 0,01 M Triethylammoniumacetatpuffer pH 5,5 verwendete.

[0084] Bei der mit den erfindungsgemäßen Primern durchgeführten Amplifikation kann es sich insbesondere um die PCR-Technik (PCR = Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion) handeln, wie sie von Saiki et al. (12) und in den Patenten US-A-4 683 195, 4 683 202, 4 889 818 beschrieben wurde.

[0085] Für die PCR kann man eine denaturierte Doppelstrang-DNA oder eine cDNA, die aus einer RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase erhalten worden ist, verwenden, wie dies oben erwähnt ist.

[0086] Bei dem Polymerisationsmittel handelt es sich um eine DNA-Polymerase, insbesondere um die Taq-Polymerase.

[0087] Im allgemeinen wird der Amplifikationszyklus 25 bis 40 mal wiederholt.

[0088] Die Sonden, die man für den Nachweis von amplifizierten Sequenzen verwendet, können durch Markierung von Oligonuklotiden mit einem Radioisotop erhalten werden, was zu einem Nachweis mittels Autoradiographie führt, oder durch Kopplung mit einem Enzym wie Peroxidase (ECL-Amersham-System), alkalische Phosphatase oder β-Galactosidase (Tropix-Ozyme-System), was zu einem Chemolumineszenznachweis führt.

[0089] In dem folgenden Beispiel wird die Durchführung des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens veranschaulicht.

[0090] Periphere Lymphozyten eines gesunden Probanden wurden durch Zentrifugation mit einem Dichtegradienten erzeugt. Die Gesamt-RNA wurde nach dem Ein-Stufen-Verfahren durch Extraktion mit Guanidiniumisothiocyanat, Phenol und Chloroform (Chomczynski, 11) extrahiert. Die Komplementär-DNA wurde in einem Endvolumen von 20 µl bei 42°C im Verlauf von einer Stunde synthetisiert, und zwar mit 1 bis 5 µg Gesamt-RNA, reverser Transkriptase und dem Cα-Primer B (1,25 µM).

[0091] Das erhaltene Material wurde anschließend drei Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend wurde damit eine Amplifikation gemäß der PCR-Technik durchgeführt, wobei man parallel jeden der spezifischen Vα-Primer, der den Sequenzen SEQ ID Nr. 26 bis 54 entsprach, und den für die Cα-Region spezifischen Cα-Primer B (SEQ ID Nr. 56) verwendete. Dies Amplifikation wurde in einem Endvolumen von 10 µl pro Röhrchen durchgeführt, das 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,1% (Gewicht/Volumen) Gelatine, 200 µM dNTP, 0,25 Einheiten Taq-Polymerase und 0,25 µM jedes Primers enthielt. In jedem Röhrchen wurde eine Kontrollamplifikation durchgeführt, und zwar ausgehend von 25 mM eines mittels PCR hergestellten 877 Basenpaaren großen β-Actin-DNA-Fragments und von den actinspezifischen Primern Act1 und Act2 (SEQ ID Nr. 58 und 59). Es wurden 30 Amplifikationszyklen durchgeführt, woran sich ein abschließender Elongationsschritt von fünf Minuten bei 72°C anschloß. Jeder Zyklus umfaßte einen einminütigen Denaturierungsschritt bei 94°C, einen einminütigen Hybridisierungsschritt bei 65°C und eine einminütige Elongationsdauer bei 72°C.

[0092] Die erhaltenen Produkte wurden mittels Elektrophorese auf einem 2%igen Agarosegel getrennt, auf Nylonmembranen in einen alkalischen Puffer übertragen und gleichzeitig mit den Cα-C-(SEQ ID Nr. 57) und Act 3-(SEQ ID Nr. 60) Oligonukleotidsonden, die mit dem Enzym Polynukleotidyl-T4-Kinase mit 32P markiert worden waren, hybridisiert. Die Hybridisierung wurde 16 Stunden lang bei 42°C durchgeführt, und zwar in einem Puffer, der 6 × SSC, 0,5% SDS, 5 × Denhart's, 0,05 PO_4H_2Na und 100 µg denaturiertes Lachssperma-DNA pro ml enthielt. Die Membranen wurden anschließend zweimal bei Raumtemperatur fünf Minuten lang und einmal bei 50°C 30 Minuten lang mit 6 × SSC, 20 mM PO_4H_2Na gewaschen und anschließend wurde damit eine Autoradiographie angefertigt.

[0093] Die Ergebnisse sind in **Abb. 4** dargestellt.

[0094] Mit Hilfe der Actinkontrolle (Bande mit 877 Basenpaaren), kann man die Amplifikation in allen Näpfchen verifizieren. Unterhalb dieser Bande erscheint ein spezifisches Signal, dessen Größe der Größe der entsprechenden amplifizierten Fragmente entspricht, wobei jedes Fragment eine Länge aufweist, die dem Abstand zwischen der Plazierung des spezifischen Vα-Oligonukleotids und dem Cα-Primer entspricht.

[0095] Bei dem geprüften Probanden wird in **Abb. 4** die bevorzugte Expression von gewissen Genabschnitten, die im Vergleich zu anderen definiert sind, nachgewiesen. So sind zum Beispiel die Unterfamilien Vα 27, 28 und 29 weniger stark vertreten als die Unterfamilien Vα 2, 3 und 6.

LITERATURANGABEN:

1. Meuer, S.C. et al., J. Exp. Med. 1983. 157:705.
2. Moingeon, P. et al., Nature 1986a. 323:638.
3. Brenner, M.B. et al., Nature 1986. 322:145.
4. Bank, I. et al., Nature 1986. 322:179.
5. Davis, M.M. et al., Nature 1988.334:395.
6. Crews, S. et al., Cell 1981. 25:59.
7. Concannon, P. et al., Proc.Natl. Acad. Sci. USA 1986. 83:6598.
8. Kimura, N. et al., Eur. J. Immunol. 1987. 17:375.
9. Wilson, R. K. et al., Immunological Reviews 1988c. 101:149.
10. Chirgwin, J.M. et al., Biochemistry 1979. 18:5294.
11. Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. 1987, 162:156.
12. Saiki, R. K. et al., Science 1988. 239:487. 13. Loh, E.Y. et al., Science 1989. 243:217.
14. Sanger, F. et al., Proc.Natl. Acad. Sci. USA 1977. 74:5463.
15. Lipman, D.J. et al., Science 1985. 227:1435. 16. Kozak, M., Nucl. Acids Res. 1984. 12:857.
17. Kyte, J. et al., R.F., J. Mol. Biol. 1982. 157:105.
18. Triebel, F. et al., J. Immun. 1988. 140:300.
19. Feinberg, A.P. et al., Anal. Biochem. 1983. 132:6.
20. Mengle-Gaw, L. et al., The EMBO Journal, 1987. 6:2273.
21. Klein, M.H. et al., Proc.Natl. Acad. Sci. USA 1987. 84:6884.
22. Yoshikai, Y. et al., J. Exp. med. 1986. 164:90.
23. Naudenbark A. et al., Nature, 341, 541.
24. Janeway C., Nature, 341, 482.
25. Lin Y., J. Exp. Med., 171, 221.
26. Acha-Orbea H., EMBO Journal, 1990,9, 12, 3815.
27. Kappler J., Science, 244, 811
28. Choi, Y., PNAS, 86, 8941.
29. Nitta T. et al., Science 1990, 249, 672.
30. Sottini A. et al., Eur. J. Immunol., 1991, 21, 461.
31. Hinkkanen A. et al., Immunogenetics, 1989, 29, 131.
32. Bernard 0. et al., Oncogene, 1988, 2, 195.
33. Sinha N. et al., Nucleic Acids Res. 1984, 12, 4539.

SEQUENZBESCHREIBUNG

I - ALLGEMEINE INFORMATION

(1) ANMELDERIN: Fa. ROUSSEL UCLAF

(2) ANMELDETITEL:

Nukleotidsequenzen, die für variable Regionen der α-Ketten menschlicher T-Zellen-Rezeptoren kodieren, entsprechende Peptidabschnitte und ihre Anwendungen in der Diagnose und Therapie.

(3) ANZAHL DER SEQUENZEN: 62

II - INFORMATION ZU SEQ ID NR. 1

SEQUENZCHARAKTERISTIKA

ART: Nukleotid und sein entsprechendes Protein

LÄNGE: 371 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: ADNc für ARNm

URSPRUNG

ORGANISMUS: Mensch

ZELLINIE: Human-T-Lymphozyten

EIGENSCHAFTEN

BEZEICHNUNG DER DNA: IGR a 02

SEQUENZ Vα w24

SEQUENZBESCHREIBUNG

```
                AGTCAACTTC TGGGAGCAGT CTCTGCAGAA TAAAA ATG AAA AAG CAT    47
                                                       Met Lys Lys His
                                                        1

CTG ACG ACC TTC TTG GTG ATT TTG TGG CTT TAT TTT TAT AGG GGG AAT            95
Leu Thr Thr Phe Leu Val Ile Leu Trp Leu Tyr Phe Tyr Arg Gly Asn
5                   10                  15                  20

GGC AAA AAC CAA GTG GAG CAG AGT CCT CAG TCC CTG ATC ATC CTG GAG           143
Gly Lys Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu
                25                  30                  35

GGA AAG AAC TGC ACT CTT CAA TGC AAT TAT ACA GTG AGC CCC TTC AGC           191
Gly Lys Asn Cys Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser
            40                  45                  50

AAC TTA AGG TGG TAT AAG CAA GAT ACT GGG AGA GGT CCT GTT TCC CTG           239
Asn Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu
        55                  60                  65

ACA ATC ATG ACT TTC AGT GAG AAC ACA AAG TCG AAC GGA AGA TAT ACA           287
Thr Ile Met Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr
    70                  75                  80

GCA ACT CTG GAT GCA GAC ACA AAG CAA AGC TCT CTG CAC ATC ACA GCC           335
Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala
85                  90                  95                  100

TCC CAG CTC AGC GAT TCA GCC TCC TAC ATC TGT GTG                           371
Ser Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val
                105                 110
```

III - INFORMATION ZU SEQ ID NR. 2

SEQUENZCHARAKTERISTIKA

ART: Nukleotid und sein entsprechendes Protein

LÄNGE: 400 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: ADNc für ARNm

URSPRUNG

ORGANISMUS: Mensch

ZELLINIE: Human-T-Lymphozyten

EIGENSCHAFTEN

BEZEICHNUNG DER DNA: IGR a 03

SEQUENZ Vα w25

SEQUENZBESCHREIBUNG

```
                    GACTCTAAGC CCAAGAGAGT TTCTTGAAGC AAAAAAAAAA    40

AAAACCCATT CAGGAAATAA TTCTTTGCTG ATAAGG ATG CTC CTT GAA CAT TTA    94
                                        Met Leu Leu Glu His Leu
                                        1               5

TTA ATA ATC TTG TGG ATG CAG CTG ACA TGG GTC AGT GGT CAA CAG CTG   142
Leu Ile Ile Leu Trp Met Gln Leu Thr Trp Val Ser Gly Gln Gln Leu
            10                  15                  20

AAT CAG AGT CCT CAA TCT ATG TTT ATC CAG GAA GGA GAA GAT GTC TCC   190
Asn Gln Ser Pro Gln Ser Met Phe Ile Gln Glu Gly Glu Asp Val Ser
        25                  30                  35

ATG AAC TGC ACT TCT TCA AGC ATA TTT AAC ACC TGG CTA TGG TAC AAG   238
Met Asn Cys Thr Ser Ser Ser Ile Phe Asn Thr Trp Leu Trp Tyr Lys
    40                  45                  50

CAG GAC CCT GGG GAA GGT CCT GTC CTC TTG ATA GCC TTA TAT AAG GCT   286
Gln Asp Pro Gly Glu Gly Pro Val Leu Leu Ile Ala Leu Tyr Lys Ala
55                  60                  65                  70

GGT GAA TTG ACC TCA AAT GGA AGA CTG ACT GCT CAG TTT GGT ATA ACC   334
Gly Glu Leu Thr Ser Asn Gly Arg Leu Thr Ala Gln Phe Gly Ile Thr
                75                  80                  85

AGA AAG GAC AGC TTC CTG AAT ATC TCA GCA TCC ATA CCT AGT GAT GTA   382
Arg Lys Asp Ser Phe Leu Asn Ile Ser Ala Ser Ile Pro Ser Asp Val
            90                  95                  100

GGC ATC TAC TTC TGT GCT                                           400
Gly Ile Tyr Phe Cys Ala
        105
```

IV - INFORMATION ZU SEQ ID NR. 3

SEQUENZCHARAKTERISTIKA

ART: Nukleotid und sein entsprechendes Protein

LÄNGE: 339 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: ADNc für ARNm

URSPRUNG

ORGANISMUS: Mensch

ZELLINIE: Human-T-Lymphozyten

EIGENSCHAFTEN

BEZEICHNUNG DER DNA: IGR a 04

SEQUENZ Vα w26

SEQUENZBESCHREIBUNG

```
     AGCTAAGGG ATG GAG ACT GTT CTG CAA GTA CTC CTA GGG ATA TTG GGG    48
               Met Glu Thr Val Leu Gln Val Leu Leu Gly Ile Leu Gly
               1               5                   10

TTC CAA GCA GCC TGG GTC AGT AGC CAA GAA CTG GAG CAG AGT CCT CAG    96
Phe Gln Ala Ala Trp Val Ser Ser Gln Glu Leu Glu Gln Ser Pro Gln
    15                  20                  25

TCC TTG ATC GTC CAA GAG GGA AAG AAT CTC ACC ATA AAC TGC ACG TCA   144
Ser Leu Ile Val Gln Glu Gly Lys Asn Leu Thr Ile Asn Cys Thr Ser
30                  35                  40                  45

TCA AAG ACG TTA TAT GGC TTA TAC TGG TAT AAG CAA AAG TAT GGT GAA   192
Ser Lys Thr Leu Tyr Gly Leu Tyr Trp Tyr Lys Gln Lys Tyr Gly Glu
                50                  55                  60

GGT CTT ATC TTC TTG ATG ATG CTA CAG AAA GGT GGG GAA GAG AAA AGT   240
Gly Leu Ile Phe Leu Met Met Leu Gln Lys Gly Gly Glu Glu Lys Ser
            65                  70                  75

CAT GAA AAG ATA ACT GCC AAG TTG GAT GAG AAA AAG CAG CAA AGT TCC   288
His Glu Lys Ile Thr Ala Lys Leu Asp Glu Lys Lys Gln Gln Ser Ser
        80                  85                  90

CTG CAT ATC ACA GCC TCC CAG CCC AGC CAT GCA GGC ATC TAC CTC TGT   336
Leu His Ile Thr Ala Ser Gln Pro Ser His Ala Gly Ile Tyr Leu Cys
    95                  100                 105

GGA                                                               339
Gly
110
```

V - INFORMATION ZU SEQ ID NR. 4

SEQUENZCHARAKTERISTIKA

ART: Nukleotid und sein entsprechendes Protein

LÄNGE: 335 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: ADNc für ARNm

URSPRUNG

ORGANISMUS: Mensch

ZELLINIE: Human-T-Lymphozyten

EIGENSCHAFTEN

BEZEICHNUNG DER DNA: IGR a 05

SEQUENZ Vα w27

SEQUENZBESCHREIBUNG

```
            AGAAAAAAAA AATGAAGAAG CTACTAGCAA TGATCCTGTG GCTTCAAGTA      50

             GACCGGTTAA GTGGAGAGCT GAAAGTG GAA CAA AAC CCT CTG TTC      95
                                       Glu Gln Asn Pro Leu Phe
                                        1               5

CTG AGC ATG CAG GAG GGA AAA AAC TAT ACC ATC TAC TGC AAT TAT TCA     143
Leu Ser Met Gln Glu Gly Lys Asn Tyr Thr Ile Tyr Cys Asn Tyr Ser
            10                  15                  20

ACC ACT TCA GAC AGA CTG TAT TGG TAC AGG CAG GAT CCT GGG AAA AGT     191
Thr Thr Ser Asp Arg Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Lys Ser
        25                  30                  35

CTG GAA TCT CTG TTT GTG TTG CTA TCA AAT GGA GCA GTG AAG CAG GAG     239
Leu Glu Ser Leu Phe Val Leu Leu Ser Asn Gly Ala Val Lys Gln Glu
    40                  45                  50

GGA CGA TTA ATG GCC TCA CTT GAT ACC AAA GCC CGT CTC AGC ACC CTC     287
Gly Arg Leu Met Ala Ser Leu Asp Thr Lys Ala Arg Leu Ser Thr Leu
55                  60                  65                  70

CAC ATC ACA GCT GCC CTG CAT GAC CTC TCT GCC ACC TAC TTC TGT GCC     335
His Ile Thr Ala Ala Val His Asp Leu Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
                75                  80                  85
```

VI - INFORMATION ZU SEQ ID NR. 5

SEQUENZCHARAKTERISTIKA

ART: Nukleotid und sein entsprechendes Protein

LÄNGE: 361 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: ADNc für ARNm

URSPRUNG

ORGANISMUS: Mensch

ZELLINIE: Human-T-Lymphozyten

EIGENSCHAFTEN

BEZEICHNUNG DER DNA: IGR a 07

SEQUENZ Vα w29

SEQUENZBESCHREIBUNG

```
                GAAGCTGACT GGATATTCTG GCAGGCCAAG G ATG GAG ACT CTC CTG    46
                                                   Met Glu Thr Leu Leu
                                                   1               5

AAA GTG CCT TCA GGC ACC TTG TTG TGG CAG TTG ACC TGG GTG GGA AGC    94
Lys Val Pro Ser Gly Thr Leu Leu Trp Gln Leu Thr Trp Val Gly Ser
            10                  15                  20

CAA CAA CCA GTG CAG AGT CCT CAA GCC GTG ATC CTC CGA GAA GGG GAA   142
Gln Gln Pro Val Gln Ser Pro Gln Ala Val Ile Leu Arg Glu Gly Glu
        25                  30                  35

GAT GCT GTC ACC AAC TGC AGT TCC TCC AAG GCT TTA TAT TCT GTA CAC   190
Asp Ala Val Thr Asn Cys Ser Ser Ser Lys Ala Leu Tyr Ser Val His
    40                  45                  50

TGG TAC AGG CAG AAG CAT GGT GAA GCA CCC GTC TTC CTG ATG ATA TTA   238
Trp Tyr Arg Gln Lys His Gly Glu Ala Pro Val Phe Leu Met Ile Leu
55                  60                  65

CTG AAG GGT GGA GAA CAG ATG CGT CGT GAA AAA ATA TCT GCT TCA TTT   286
Leu Lys Gly Gly Glu Gln Met Arg Arg Glu Lys Ile Ser Ala Ser Phe
70                  75                  80                  85

AAT GAA AAA AAG CAG CAA AGC TCC CTG TAC CTT ACG GCC TCC CAG CTC   334
Asn Glu Lys Lys Gln Gln Ser Ser Leu Tyr Leu Thr Ala Ser Gln Leu
                90                  95                  100

AGT TAC TCA GGA ACC TAC TTC TGC GGG                              361
Ser Tyr Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Gly
            105                 110
```

VII - INFORMATION ZU SEQ ID NR. 6

SEQUENZCHARAKTERISTIKA

ART: Nukleotid und sein entsprechendes Protein

LÄNGE: 569 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: ADNc für ARNm

URSPRUNG

ORGANISMUS: Mensch

ZELLINIE: Human-T-Lymphozyten

EIGENSCHAFTEN

BEZEICHNUNG DER DNA: IGR a 08

SEQUENZ Vα 1

SEQUENZBESCHREIBUNG

```
                                                                  TCAGTTTCTT  10

CTTCCTGCAG CTGGTTGAGT TCTTTCCAGA CAAAGACAAG TGACAAGAAT TAGAGGTTTA  70

AAAAGCAACC AGATTCATCT CAGCAGCTTT TGTAGTTTTA AATAAGCAAG GAGTTTCTCC 130

AGCGAAACTT CCTCACACCT CTTGGTCTTG GTCTCTTCAG ACACTTTCCT TCCTGTTCTC 190

TGGAGATCTT GCAGAAAAGA GCCTGCAGTG TTTCCCTTGC TCAGCC ATG CTC CTG    245
                                                     Met Leu Leu
                                                      1

GAG CTT ATC CCA CTG CTG GGG ATA CAT TTT GTC CTG AGA ACT GCC AGA    293
Glu Leu Ile Pro Leu Leu Gly Ile His Phe Val Leu Arg Thr Ala Arg
    5                  10                  15

GCC CAG TCA GTG ACC CAG CCT GAC ATC CAC ATC ACT GTC TCT GAA GGA  341
Ala Gln Ser Val Thr Gln Pro Asp Ile His Ile Thr Val Ser Glu Gly
20                  25                  30                  35

GCC TCA CTG GAG TTG AGA TGT AAC TAT TCC TAT GGG GCA ACA CCT TAT  389
Ala Ser Leu Glu Leu Arg Cys Asn Tyr Ser Tyr Gly Ala Thr Pro Tyr
                40                  45                  50

CTC TTC TGG TAT GTC CAG TCC CCC GGC CAA GGC CTC CAG CTG CTC CTG  437
Leu Phe Trp Tyr Val Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Gln Leu Leu Leu
            55                  60                  65

AAG TAC TTT TCA GGA GAC ACT CTG GTT CAA GGC ATT AAA GGC TTT GAG  485
Lys Tyr Phe Ser Gly Asp Thr Leu Val Gln Gly Ile Lys Gly Phe Glu
        70                  75                  80

GCT GAA TTT AAG AGG AGT CAA TCT TCC TTC AAC CTG AGG AAA CCC TCT  533
Ala Glu Phe Lys Arg Ser Gln Ser Ser Phe Asn Leu Arg Lys Pro Ser
    85                  90                  95

GTC CAT TGG AGT GAT GCT GCT GAG TAC TTC TGT GCT                  569
Val His T_p Ser Asp Ala Ala Glu Tyr Phe Cys Ala
100                 105                 110
```

VIII - INFORMATION ZU SEQ ID NR. 7

SEQUENZCHARAKTERISTIKA

ART: Nukleotid und sein entsprechendes Protein

LÄNGE: 330 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: ADNc für ARNm

KONSENSUSSEQUENZ

URSPRUNG

ORGANISMUS: Mensch

ZELLINIE: Human-T-Lymphozyten

EIGENSCHAFTEN

BEZEICHNUNG DER DNA: IGR a 09

SEQUENZ Vα 2

SEQUENZBESCHREIBUNG

```
AAA TCC TTG AGA GTT TTA CTA GTG ATC CTG TGG CTT CAG CTG AGC CGG    48
Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser Arg
1               5                  10                  15

GTT TGG AGC CAA CAG AAG GAG GTG GAG CAG AAT TCT GGA CCC CTC AGT    96
Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser
            20                  25                  30

GTT CCA GAG GGA GCC ATT GCC TCT CTC AAC TGC ACT TAC AGT GAC CGA   144
Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg
        35                  40                  45

GGT TCC CAG TCC TTC TTC TGG TAC AGA CAA TAT TCT GGG AAA AGC CCT   192
Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro
    50                  55                  60

GAG TTG ATA ATG TCC ATA TAC TCC AAT GGT GAC AAA GAA GAT GGA AGG   240
Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg
65                  70                  75                  80

TTT ACA GCA CAG CTC AAT AAA GCC AGC CAG TAT GTT TCT CTG CTC ATC   288
Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile
                85                  90                  95

AGA GAC TCC CAG CCC AGT GAT TCA GCC ACC TAC CTC TGT GCC           330
Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala
            100                 105                 110
```

IX - INFORMATION ZU SEQ ID NR. 8

SEQUENZCHARAKTERISTIKA

ART: Nukleotid und sein entsprechendes Protein

LÄNGE: 400 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: ADNc für ARNm

KONSENSUSSEQUENZ

URSPRUNG

ORGANISMUS: Mensch

ZELLINIE: Human-T-Lymphozyten

EIGENSCHAFTEN

BEZEICHNUNG DER DNA: IGR a 10

SEQUENZ Vα 5

SEQUENZBESCHREIBUNG

```
                GCCAAACAGA ATGGCTTTTT GGCTGAGAAG GCTGGGTCTA CATTTCAGGC     50

                CACATTTGGG GAGACGA ATG GAG TCA TCC CTG GGA GGT GTT TTG      94
                                   Met Glu Ser Ser Leu Gly Gly Val Leu
                                   1               5

CTG ATT TTG TGG CTT CAA GTG GAC TGG GTG AAG AGC CAA AAG ATA GAA    142
Leu Ile Leu Trp Leu Gln Val Asp Trp Val Lys Ser Gln Lys Ile Glu
10                  15                  20                  25

CAG AAT TCC GAG GCC CTG AAC ATT CAG GAG GGT AAA ACG GCC ACC CTG    190
Gln Asn Ser Glu Ala Leu Asn Ile Gln Glu Gly Lys Thr Ala Thr Leu
                30                  35                  40

ACC TGC AAC TAT ACA AAC TAT TCT CCA GCA TAC TTA CAG TGG TAC CGA    238
Thr Cys Asn Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ala Tyr Leu Gln Trp Tyr Arg
            45                  50                  55

CAA GAT CCA GGA AGA GGC CCT GTT TTC TTG CTA CTC ATA CGT GAA AAT    286
Gln Asp Pro Gly Arg Gly Pro Val Phe Leu Leu Leu Ile Arg Glu Asn
        60                  65                  70

GAG AAA GAA AAA AGG AAA GAA AGA CTG AAG GTC ACC TTT GAT ACC ACC    334
Glu Lys Glu Lys Arg Lys Glu Arg Leu Lys Val Thr Phe Asp Thr Thr
    75                  80                  85

CTT AAA CAG AGT TTG TTT CAT ATC ACA GCC TCC CAG CCT GCA GAC TCA    382
Leu Lys Gln Ser Leu Phe His Ile Thr Ala Ser Gln Pro Ala Asp Ser
90                  95                  100                 105

GCT ACC TAC CTC TGT GCT                                            400
Ala Thr Tyr Leu Cys Ala
                110
```

X - INFORMATION ZU SEQ ID NR. 9

SEQUENZCHARAKTERISTIKA

ART: Nukleotid und sein entsprechendes Protein

LÄNGE: 386 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: ADNc für ARNm

KONSENSUSSEQUENZ

URSPRUNG

ORGANISMUS: Mensch

ZELLINIE: Human-T-Lymphozyten

EIGENSCHAFTEN

BEZEICHNUNG DER DNA: IGR a 11

SEQUENZ Vα 7

SEQUENZBESCHREIBUNG

```
                GCCTTCTGCA GACTCCAATG GCTCAGGAAC TGGGAATGCA GTGCCAGGCT     50

                CGTGGTATCC TGCAGCAG ATG TGG GGA GTT TTC CTT CTT TAT GTT     95
                                    Met Trp Gly Val Phe Leu Leu Tyr Val
                                    1               5

TCC ATC AAG ATG GGA GGC ACT ACA GGA CAA AAC ATT GAC CAG CCC ACT    143
Ser Met Lys Met Gly Gly Thr Thr Gly Gln Asn Ile Asp Gln Pro Thr
10                  15                  20                  25

GAG ATG ACA GCT ACG GAA GGT GCC ATT GTC CAG ATC AAC TGC ACG TAC    191
Glu Met Thr Ala Thr Glu Gly Ala Ile Val Gln Ile Asn Cys Thr Tyr
                30                  35                  40

CAG ACA TCT GGG TTC AAC GGG CTG TTC TGG TAC CAG CAA CAT GCT GGC    239
Gln Thr Ser Gly Phe Asn Gly Leu Phe Trp Tyr Gln Gln His Ala Gly
            45                  50                  55

GAA GCA CCC ACA TTT CTG TCT TAC AAT GTT CTG GAT GGT TTG GAG GAG    287
Glu Ala Pro Thr Phe Leu Ser Tyr Asn Val Leu Asp Gly Leu Glu Glu
        60                  65                  70

AAA GGT CGT TTT TCT TCA TTC CTT AGT CGG TCT AAA GGG TAC AGT TAC    335
Lys Gly Arg Phe Ser Ser Phe Leu Ser Arg Ser Lys Gly Tyr Ser Tyr
    75                  80                  85

CTC CTT TTG AAG GAG CTC CAG ATG AAA GAC TCT GCC TCT TAC CTC TGT    383
Leu Leu Leu Lys Glu Leu Gln Met Lys Asp Ser Ala Ser Tyr Leu Cys
90                  95                  100                 105

GCT                                                                386
Ala
```

XI - INFORMATION ZU SEQ ID NR. 10

SEQUENZCHARAKTERISTIKA

ART: Nukleotid und sein entsprechendes Protein

LÄNGE: 383 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: ADNc für ARNm

URSPRUNG

ORGANISMUS: Mensch

ZELLINIE: Human-T-Lymphozyten

EIGENSCHAFTEN

BEZEICHNUNG DER DNA: IGR a 12

SEQUENZ Vα 22

SEQUENZBESCHREIBUNG

```
                TGTGACTTCT TCATGTTAAG GATCAAGACC ATTATTTGGG TAACACACTA     50

        AAG ATG AAC TAT TCT CCA GGC TTA GTA TCT CTG ATA CTC TTA CTG         95
            Met Asn Tyr Ser Pro Gly Leu Val Ser Leu Ile Leu Leu Leu
            1               5                  10

CTT GGA AGA ACC CGT GGA GAT TCA GTG ACC CAG ATG GAA GGG CCA GTG        143
Leu Gly Arg Thr Arg Gly Asp Ser Val Thr Gln Met Glu Gly Pro Val
15              20                  25                  30

ACT CTC TCA GAA GAG GCC TTC CTG ACT ATA AAC TGC ACG TAC ACA GCC        191
Thr Leu Ser Glu Glu Ala Phe Leu Thr Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Ala
                35                  40                  45

ACA GGA TAC CCT TCC CTT TTC TGG TAT GTC CAA TAT CCT GGA GAA GGT        239
Thr Gly Tyr Pro Ser Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Gly Glu Gly
            50                  55                  60

CTA CAG CTC CTC CTG AAA GCC ACG AAG GCT GAT GAC AAG GGA AGC AAC        287
Leu Gln Leu Leu Leu Lys Ala Thr Lys Ala Asp Asp Lys Gly Ser Asn
        65                  70                  75

AAA GGT TTT GAA GCC ACA TAC CGT AAA GAA ACC ACT TCT TTC CAC TTG        335
Lys Gly Phe Glu Ala Thr Tyr Arg Lys Glu Thr Thr Ser Phe His Leu
    80                  85                  90

GAG AAA GGC TCA GTT CAA GTG TCA GAC TCA GCG GTG TAC TTC TGT GCT        383
Glu Lys Gly Ser Val Gln Val Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala
95                  100                 105                 110
```

XII - INFORMATION ZU SEQ ID NR. 11

SEQUENZCHARAKTERISTIKA

ART: Nukleotid und sein entsprechendes Protein

LÄNGE: 364 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: ADNc für ARNm

URSPRUNG

ORGANISMUS: Mensch

ZELLINIE: Human-T-Lymphozyten

EIGENSCHAFTEN

BEZEICHNUNG DER DNA: IGR a 13

SEQUENZ Vα 16

SEQUENZBESCHREIBUNG

```
            AATCCCGCCC GCCGTGAGCT TAGCTGGAGC C ATG GCC TCT GCA CCC    46
                                               Met Ala Ser Ala Pro
                                               1               5

ATC TCG ATG CTT GCG ATG CTC TTC ACA TTG AGT GGG CTG AGA GCT CAG    94
Ile Ser Met Leu Ala Met Leu Phe Thr Leu Ser Gly Leu Arg Ala Gln
                10                  15                  20

TCA GTG GCT CAG CCG GAA GAT CAG GTC AAC GTT GCT GAA GGG AAT CCT   142
Ser Val Ala Gln Pro Glu Asp Gln Val Asn Val Ala Glu Gly Asn Pro
            25                  30                  35

CTG ACT GTG AAA TGC ACC TAT TCA GTC TCT GGA AAC CCT TAT CTT TTT   190
Leu Thr Val Lys Cys Thr Tyr Ser Val Ser Gly Asn Pro Tyr Leu Phe
        40                  45                  50

TGG TAT GTT CAA TAC CCC AAC CGA GGC CTC CAG TTC CTT CTG AAA TAC   238
Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Asn Arg Gly Leu Gln Phe Leu Leu Lys Tyr
    55                  60                  65

ATC ACA GGC GAT AAC CTG GTT AAA GGC AGC TAT GGC TTT GAA GCT GAA   286
Ile Thr Gly Asp Asn Leu Val Lys Gly Ser Tyr Gly Phe Glu Ala Glu
70                  75                  80                  85

TTT AAC AAG AGC CAA ACC TCC TTC CAC CTG AAG AAA CCA TCT GCC CTT   334
Phe Asn Lys Ser Gln Thr Ser Phe His Leu Lys Lys Pro Ser Ala Leu
                90                  95                  100

GTG AGC GAC TCC GCT TTG TAC TTC TGT GCT                          364
Val Ser Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala
            105                 110
```

XIII - INFORMATION ZU SEQ ID NR. 12

SEQUENZCHARAKTERISTIKA

ART: Nukleotid und sein entsprechendes Protein

LÄNGE: 264 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: ADNc für ARNm

URSPRUNG

ORGANISMUS: Mensch

ZELLINIE: Human-T-Lymphozyten

EIGENSCHAFTEN

BEZEICHNUNG DER DNA: Ja 01

SEQUENZ Jα

SEQUENZBESCHREIBUNG

```
CCTTCAAGGA AAATTAAGGC AAATAGAATT GGGCTGGGGA GTTGCTACTT ATTAGTATTC  60

CTCCCACGTT CTAACCTAAT TATAAGGAGG TTGTTTTGGC CATGGGCAGT CATCTCAGGT 120

TTTGTTTTCC TGCTTTCCTC CCTAACCTCC ACCTGTCTTC CTAGAGGCCT GAGTCAAGGT 180

TATTGCAATA GCACTAAAGA CTGTGT AAC ACC AAT GCA GGC AAA TCA ACC TTT  233
                              Asn Thr Asn Ala Gly Lys Ser Thr Phe
                              1               5

GGG GAT GGG ACT ACG CTC ACT GTG AAG CCA                           264
Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro
10                  15
```

XIV - INFORMATION ZU SEQ ID NR. 13

SEQUENZCHARAKTERISTIKA

ART: Nukleotid und sein entsprechendes Protein

LÄNGE: 277 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: ADNc für ARNm

URSPRUNG

ORGANISMUS: Mensch

ZELLINIE: Human-T-Lymphozyten

EIGENSCHAFTEN

BEZEICHNUNG DER DNA: Ja 02

SEQUENZ Jα

SEQUENZBESCHREIBUNG

```
AAGGACACAG ACTGCCTGCA TGAAGCCTGG AGCTGGGCCC AGGATGAGGA AAGGCCTCAG   60

GAACGAAGGG CTGACACGAA ATAAGGAATA CCATGGCATT CATGAGATGT GCGTCTGAAT  120

CCTCTCTCTT GCCTGAGAAG CTTTAGCTTC CACCTTGAGA CACAAAACAT GTGGTTATGA  180

AGAGATGACA AGGTTTTTGT AAAAGAATGA GCCATTGTGG ATA GGC TTT GGG AAT    234
                                              Ile Gly Phe Gly Asn
                                           1                  5

GTG CTG CAT TGC GGG TCC GGC ACT CAA GTG ATT GTT TTA CCA            277
Val Leu His Cys Gly Ser Gly Thr Gln Val Ile Val Leu Pro
               10                  15
```

XVI - INFORMATION ZU SEQ ID NR. 15

SEQUENZCHARAKTERISTIKA

ART: Nukleotid und sein entsprechendes Protein

LÄNGE: 60 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: ADNc zu ARNm

URSPRUNG

ORGANISMUS: Mensch

ZELLINIE: Human-T-Lymphozyten

EIGENSCHAFTEN

BEZEICHNUNG DER DNA: Ja 04

SEQUENZ Jα

SEQUENZBESCHREIBUNG

```
TA GAT ACT GGA GGC TTC AAA ACT ATC TTT GGA GCA GGA ACA AGA CTA    47
   Asp Thr Gly Gly Phe Lys Thr Ile Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu
   1               5                  10                  15

TTT GTT AAA GCA A                                              60
Phe Val Lys Ala
```

XVII - INFORMATION ZU SEQ ID NR. 16

SEQUENZCHARAKTERISTIKA

ART: Nukleotid und sein entsprechendes Protein

LÄNGE: 59 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: ADNc für ARNm

URSPRUNG

ORGANISMUS: Mensch

ZELLINIE: Human-T-Lymphozyten

EIGENSCHAFTEN

BEZEICHNUNG DER DNA: Ja 05

SEQUENZ Jα

SEQUENZBESCHREIBUNG

```
C CTA ACT GGG GCA AAC AAC GTC TTC TTT GGG ACT GGA ACG AGA CTC    46
  Leu Thr Gly Ala Asn Asn Val Phe Phe Gly Thr Gly Thr Arg Leu
  1               5                  10                  15

ACC GTT CTT CCC T                                              59
Thr Val Leu Pro
```

XVIII - INFORMATION ZU SEQ ID NR. 17

SEQUENZCHARAKTERISTIKA

ART: Nukleotid und sein entsprechendes Protein

LÄNGE: 60 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: ADNc für ARNm

URSPRUNG

ORGANISMUS: Mensch

ZELLINIE: Human-T-Lymphozyten

EIGENSCHAFTEN

BEZEICHNUNG DER DNA: Ja 06

SEQUENZ Jα

SEQUENZBESCHREIBUNG

```
AT GGA GGA AGC CAA GGA AAT CTC ATC TTT GGA AAA GGC ACT AAA CTC    47
   Gly Gly Ser Gln Gly Asn Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu
   1               5                  10                  15

TCT GTT AAA CCA A                                              60
Ser Val Lys Pro
```

XIX - INFORMATION ZU SEQ ID NR. 18

SEQUENZCHARAKTERISTIKA

ART: Nukleotid und sein entsprechendes Protein

LÄNGE: 56 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: ADNc für ARNm

URSPRUNG

ORGANISMUS: Mensch

ZELLINIE: Human-T-Lymphozyten

EIGENSCHAFTEN

BEZEICHNUNG DER DNA: Ja 07

SEQUENZ Jα

SEQUENZBESCHREIBUNG

```
GGA GCC AAT AGT AAG CTG ACA TTT GGA AAA GGA ATA ACT CTG AGT GTT    48
Gly Ala Asn Ser Lys Leu Thr Phe Gly Lys Gly Ile Thr Leu Ser Val
1               5                  10                  15

AGA CCA GA                                                     56
Arg Pro
```

XX - INFORMATION ZU SEQ ID NR. 19

SEQUENZCHARAKTERISTIKA

ART: Nukleotid und sein entsprechendes Protein

LÄNGE: 57 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: ADNc für ARNm

URSPRUNG

ORGANISMUS: Mensch

ZELLINIE: Human-T-Lymphozyten

EIGENSCHAFTEN

BEZEICHNUNG DER DNA: Ja 08

SEQUENZ Jα

SEQUENZBESCHREIBUNG

```
CT GGT GGC TAC AAT AAG CTC ATT TTT GGA GCA GGG ACC AGG CTG GCT    47
   Gly Gly Tyr Asn Lys Leu Ile Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Ala
   1               5                  10                  15

GTA CAC CCA T                                                    57
Val His Pro
```

XXI - INFORMATION ZU SEQ ID NR. 20

SEQUENZCHARAKTERISTIKA

ART: Nukleotid und sein entsprechendes Protein

LÄNGE: 50 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: ADNc für ARNm

URSPRUNG

ORGANISMUS: Mensch

ZELLINIE: Human-T-Lymphozyten

EIGENSCHAFTEN

BEZEICHNUNG DER DNA: Ja 09

SEQUENZ Jα

SEQUENZBESCHREIBUNG

```
T GGA AAC AAC CTC GTC TTT GGC GCA GGA ACC ATT CTG AGA GTC AAG    46
  Gly Asn Lys Leu Val Phe Gly Ala Gly Thr Ile Leu Arg Val Lys
  1               5                  10                  15

TCC T                                                            50
Ser
```

XXII - INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 21 BIS 25

ART: OLIGONUKLEOTIDE
SEQUENZBESCHREIBUNG

Nr. 21 A (5'-GTTGCTCCAGGCCACAGCACTG)
Nr. 22 poly C (5'-GCATGCGCGCGGCCGCGGAGG-14C)
Nr. 23 B (5'-GTCCATAGACCTCATGTCCAGCACAG)
Nr. 24 C (5'-ATACACATCAGAATTCTTACTTTG)
Nr. 25 D (5'-GTCACTGGATTTAGAGTCT)

XXIII - INFORMATION ZU SEQ ID NR. 26 bis 63

ART: OLIGONUKLEOTIDE

SEQUENZBESCHREIBUNG

SEQ ID Nr.	Sequenz	Art	Klon	Position
26	5'-GGCATTAACGGTTTTGAGGCTGGA-3'	Vα1	AB22	235
27	5'-CAGTGTTCCAGAGGGAGCCATTGC-3'	Vα2	IGRa09	93*
28	5'-CCCGGCAGCAGACACTGCTTCTTA-3'	Vα3	HAP05	297
29	5'-TTGGTATCGACAGCTTCCCTCCCA-3'	Vα4	HAP08	153
30	5'-CGGCCACCCTGACCTGCAACTATA-3'	Vα5	IGRa10	113
31	5'-TCCGCCAACCTTGTCATCTCCGCT-3	Vα6	HAP01	287
32	5'-GCAACATGCTGGCGGAGCACCCAC-3	Vα7	IGRa11	159
33	5'-CATTCGTTCAAATGTGGGCAAAAG-3	Vα8	HAP41	204
34	5'-CCAGTACTCCAGACAACGCCTGCA-3	Vα9	HAVP36	169
35	5'-CACTGCGGCCCAGCCTGGTGATAC-3	Vα10	HAP58	202
36	5'-CGCTGCTCATCCTCCAGGTGCGGG-3'	Vα11	AB19	254*
37	5'-TCGTCGGAACTCTTTTGATGAGCA-3'	Vα12	V12MA493	213
38	5'-TTCATCAAAACCCTTGGGGACAGC-3'	Vα13	HAVT15	152*
39	5'-CCCAGCAGGCAGATGATTCTCGTT-3'	Vα14	HAVT20	181
40	5'-TTGCAGACACCGAGACTGGGGACT-3'	Vα15	HAVT31	278
41	5'-TCAACGTTGCTGAAGGGAATCCTC-3'	Vα16	IGRa13	89
42	5'-TGGGAAAGGCCGTGCATTATTGAT-3'	Vα17	AB11	204
43	5'-CAGCACCAATTTCACCTGCAGCTT-3'	Vα18	AB21	114
44	5'-ACACTGGCTGCAACAGCATCCAGG-3'	Vα19	AC24	162
45	5'-TCCCTGTTTATCCCTGCCGACAGA-3'	Vα20	AE212	232
46	5'-AGCAAAATTCACCATCCCTGAGCG-3'	Vα21	AF211	92
47	5'-CCTGAAAGCCACGAAGGCTGATGA-3'	Vα22	IGRa12	197
48	5'-TGCCTCGCTGGATAAATCATCAGG-3'	Vαw23	IGRa01	246
49	5'-CTGGATGCAGACACAAAGCAGAGC-3'	Vαw24	IGRa02	259
50	5'-TGGCThCGGTACAAGCCGGACCCT-3'	Vαw25	IGRa03	148
51	5'-AGCGCAGCCATGCAGGCATGTACC-3'	Vαw26	IGRa04	299
52	5'-AAGCCCGTCTCAGCACCCTCCACA-3'	Vαw27	IGRa05	268*
53	5'-TGGTTGTGCACGAGCGACAGACTG-3	Vαw28	IGRa06	95
54	5'-GAAGGGTGGAGAACAGATGCGTCG-3'	Vαw29	IGRa07	210
55	5'-ATACACATCAGAATTCTTACTTTG-3'	CαA		129
56	5'-GTTGCTCCAGGCCGCGGCACTGTT-3'	CαB		201
57	5'-GTCACTGGATTTAGAGTCT-3'	CαC		57
58	5'-ATTTGCGGTGGACGATGGAGGGGC-3'	Act 1	B-actine	1161
59	5'-GGCATCGTCACCAACTGGGACGAC-3'	Act 2	B-actine	261
60	5'-ACCACCACGGCGGAGCGGG-3'	Act 3	B-actine	642
61	5'-CGGGCTGCTCCTTGAGGGGCTGCG-3'	CβF		135
62	5'-CCCACCCGAGGTCGCTGTG-3'	CβK		20
63	5'-TCTGCTTCTGATGGCTCAA-3'	CβC		58

Patentansprüche

1. Nukleotidsequenz, die für eine variable Region der alpha-Kette menschlicher T-Zellen-Rezeptoren kodiert und die einer cDNA entspricht, die eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 umfaßt.

2. Nukleotidsequenz, die für eine variable Region der alpha-Kette menschlicher T-Zellen-Rezeptoren kodiert und die der Sequenz 1 bis 200 der SEQ ID Nr. 1 entspricht.

3. Peptide, die von den Nukleotidsequenzen nach einem der Ansprüche 1 bis 2 kodiert werden.

4. Expressionsvektoren, die eine DNA-Sequenz, die für eines der Peptide nach Anspruch 3 kodiert, enthalten.

5. Nichtmenschliche Wirte, die mit einem Vektor nach Anspruch 4 transformiert sind.

6. Antikörper gegen die eine antigene Determinante von einem der Peptide nach Anspruch 3.

7. Antikörper nach Anspruch 6, wobei es sich um einen monoklonalen Antikörper handelt.

8. Fab-, Fab'- oder F(ab')2-Fragment eines monoklonalen Antikörpers nach Anspruch 7.

9. Monoklonaler Antikörper oder Fragment davon nach Anspruch 7 oder 8, an die ein nachweisbarer Marker und/oder mindestens ein therapeutisches Molekül gebunden sind.

10. Hybridome, die einen Antikörper nach Anspruch 7 produzieren.

11. Diagnostische Zusammensetzung, die einen oder mehrere monoklonale Antikörper oder deren Fragmente nach einem der Ansprüche 7 bis 9 umfassen.

12. Diagnostische Zusammensetzung, die einen oder mehrere monoklonale Antikörper oder deren Fragmente nach einem der Ansprüche 7 bis 9 umfassen.

13. Zusammensetzung nach Anspruch 12, die Derivate umfaßt, die ein cytotoxisches Molekül oder ein Radioisotop enthalten.

14. Therapeutische Zusammensetzung, die mindestens eines der Peptide nach Anspruch 3 umfaßt.

15. Therapeutische Zusammensetzung, die Antisense-Oligonukleotide umfaßt, die der Sequenz eines Vα-Abschnitts nach Anspruch 2 entsprechen.

16. Verwendung von Nukleotidsequenzen mit ungefähr mindestens 17 Nukleotiden, die von der Sequenz eines Vα-Abschnitts gemäß Anspruch 2 umfaßt werden, als Primer für die Amplifikation von DNA.

17. Verwendung von Nukleotidsequenzen mit ungefähr mindestens 10 Nukleotiden, die von der Sequenz eines Vα-Abschnitts gemäß Anspruch 2 umfaßt werden, als Nachweissonde.

18. Oligonukleotid, das als Primer für die Amplifikation von DNA, die einer variablen Region der alpha-Kette von T-Zellen-Rezeptoren entspricht, verwendet werden kann, und das der Sequenz SEQ ID Nr. 49 entspricht.

19. Verwendung des Oligonukleotids nach Anspruch 18 als Primer für die Amplifikation von DNA, die einer variablen Region der alpha-Ketten des T-Zellen-Rezeptors entspricht.

20. Verfahren zum Nachweis einer Nukleotidsequenz, die für einen Vα-Abschnitt des T-Rezeptors kodiert, oder von cDNA, die dessen Transkriptionsprodukt entspricht, in einer biologischen Probe, dadurch gekennzeichnet, daß es die folgenden Schritte umfaßt
a) Amplifikation der DNA mit mindestens einem Primer-Paar, das von dem Oligonukleotid nach Anspruch 18 und einem Oligonukleotid, das zu dem Cα-Abschnitt gehört, gebildet wird, sowie
b) Nachweisen der amplifizierten Sequenzen mit einer Cα-Sonde.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man die Amplifikation in Gegenwart eines Kontroll-Primer-Paars und den Nachweis mit Hilfe einer Kontrollsonde durchführt.

22. Diagnose-Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß es
a) mindestens ein Oligonukleotid nach Anspruch 18,

b) einen Cα-Primer,
c) eine Cα-Sonde
umfaßt.

23. Diagnose-Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß es
a) mindestens ein Oligonukleotid nach Anspruch 18,
b) einen Cα-Primer,
c) ein Kontroll-Primer-Paar,
d) eine Cα-Sonde
e) eine Kontrollsonde
umfaßt.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Vα1

```
                                  1
IGRa08 AGTGTTTCCCTTGCTCAGCCATGCTCCTGGAGCTTATCCCACTGCTGGGGATAC

IGRa08 ATTTTGTCCTGAGAACTGCCAGAGCCCAGTCAGTGACCCAGCCTGACATCCACA

IGRa08 TCACTGTCTCTGAAGGAGCCTCACTGGAGTTGAGATGTAACTATTCCTATGGGG

IGRa08 CAACACCTTATCTCTTCTGGTATGTCCAGTCCCCCGGCCAAGGCCTCCAGCTGC

IGRa08 TCCTGAAGTACTTTTCAGGAGACACTCTGGTTCAAGGCATTAAAGGCTTTGAGG
AE11                                                ...................

IGRa08 CTGAATTTAAGAGGAGTCAATCTTCCTTCAACCTGAGGAAACCCTCTGTGCATT
AE11   ................................T.....................

IGRa08 GGAGTGATGCTGCTGAGTACTTCTGTGCT 333
AE11   ............................. 102
```

Abb. 1A

Vα2

```
IGRa09                                AAATCCTTGAGAGTTTTACTAGTGATCCTGTGGC

IGRa09 TTCAGCTGAGCCGGGTTTGGAGCCAACAGAAGGAGGTGGAGCAGAATTCTGGAC
AF110                                                ...........

IGRa09 CCCTCAGTGTTCCAGAGGGAGCCATTGCCTCTCTCAACTGCACTTACAGTGACC
AF110  ..................................................

IGRa09 GAGGTTCCCAGTCCTTCTTCTGGTACAGACAATATTCTGGGAAAAGCCCTGAGT
AF110  ..................................................

IGRa09 TGATAATGTCCATATACTCCAATGGTGACAAAGAAGATGGAAGGTTTACAGCAC
AF110  ..................................................

IGRa09 AGCTCAATAAAGCCAGCCAGTATGTTTCTCTGCTCATCAGAGACTCCCAGCCCA
AF110  ..................................................

IGRa09 GTGATTCAGCCACCTACCTCTGTGCC 330
AF110  ........................... 252
```

Abb. 1B

ERSATZBLATT

Vα5

```
                                  1
IGRa10 GGCCACATTTGGGGAGACGAATGGAGTCATCCCTGGGAGGTGTTTTGCTGATTT

IGRa10 TGTGGCTTCAAGTGGACTGGGTGAAGAGCCAAAAGATAGAACAGAATTCCGAGG
HAP35                                                      ....

IGRa10 CCCTGAACATTCAGGAGGGTAAAACGGCCACCCTGACCTGCAACTATACAAACT
HAP35  ..................................................

IGRa10 ATTCTCCAGCATACTTACAGTGGTACCGACAAGATCCAGGAAGAGGCCCTGTTT
HAP35  ..................................................

IGRa10 TCTTGCTACTCATACGTGAAAATGAGAAAGAAAAAAGGAAAGAAAGACTGAAGG
HAP35  ..................................................

IGRa10 TCACCTTTGATACCACCCTTAAACAGAGTTTGTTTCATATCACAGCCTCCCAGC
HAP35  ..................................................

IGRa10 CTGCAGACTCAGCTACCTACCTCTGTGCT 333
HAP35  ........................... 249
```

Abb. 1C

Vα7

```
                                  1
              IGRa11 CTCGTGGTATCCTGCAG-
CAGATGTGGGGAGTTTTCCTTCTTTATGTTTCCATGA
HAP12                 ..............................

IGRa11 AGATGGGAGGCACTACAGGACAAAACATTGACCAGCCCACTGAGATGACAGCTA
HAP12  ..................................................

IGRa11 CGGAAGGTGCCATTGTCCAGATCAACTGCACGTACCAGACATCTGGGTTCAACG
HAP12  ..................................................

IGRa11 GGCTGTTCTGGTACCAGCAACATGCTGGCGAAGCACCCACATTTCTGTCTTACA
HAP12  ..................................................

IGRa11 ATGTTCTGGATGGTTTGGAGGAGAAAGGTCGTTTTTCTTCATTCCTTAGTCGGT
HAP12  ........................

IGRa11 CTAAAGGGTACAGTTACCTCCTTTTGAAGGAGCTCCAGATGAAAGACTCTGCCT
HAP12

IGRa11 CTTACCTCTGTGCT 318
HAP12           222
```

Abb. 1D

ERSATZBLATT

Vα22

```
                                  1
IGRa12 ATTTGGGTAACACACTAAAGATGAACTATTCTCCAGGCTTAGTATCTCTGATAC

IGRa12 TCTTACTGCTTGGAAGAACCCGTGGAGATTCAGTGACCCAGATGGAAGGGCCAG

IGRa12 TGACTCTCTCAGAAGAGGCCTTCCTGACTATAAACTGCACGTACACAGCCACAG

IGRa12 GATACCCTTCCCTTTTCTGGTATGTCCAATATCCTGGAGAAGGTCTACAGCTCC

IGRa12 TCCTGAAAGCCACGAAGGCTGATGACAAGGGAAGCAACAAAGGTTTTGAAGCCA
AC9                               ..............................

IGRa12 CATACCGTAAAGAAACCACTTCTTTCCACTTGGAGAAAGGCTCAGTTCAAGTGT
AC9    ..................................................

IGRa12 CAGACTCAGCGGTGTACTTCTGTGCT  330
AC9    .........................  113
```

Abb. 1E

ERSATZBLATT

F G G 1

IGRJa01G GGTTATTGCAATAGCACTAAAGACTGTGTAACACCAATGCAGGCAAATCAACCTTTGGGGATGGGACTACGCTCACTGTGAAGCCA

IGRJa02G GGTTTTTGTAAAAGAATGAGCCATTGTGGATAGGCTTTGGGAATGTGCTGCATTGCGGGTCCGGCACTCAAGTGATTGTTTTACCA

IGRJa04 TAGATACTGGAGGCTTCAAAACTATCTTTGGAGCAGGAACAAGACTATTTGTTAAAGCA

IGRJa05 CCTAACTGGGGCAAACAACGTCTTCTTTGGGACTGGAACGAGACTCACCGTTCTTCCC

IGRJa06 ATGGAGGAAGCCAAGGAAATCTCATCTTTGGAAAAGGCACTAAACTCTCTGTTAAACCA

IGRJa07 GGAGCCAATAGTAAGCTGACATTTGGAAAAGGAATAACTCTGAGTGTTAGACCA

IGRJa08 CTGGTGGCTACAATAAGCTGATTTTTGGAGCAGGGACCAGGCTGGCTGTACACCCA

IGRJa09 TGGAAACAAGCTGGTCTTTGGCGCAGGAACCATTCTGAGAGTCAAGTCC

Abb. 2

SEQ ID Nr. 1_SEQ ID Nr. 2_SEQ ID Nr. 3_SEQ ID Nr. 4_SEQ ID Nr. 5_

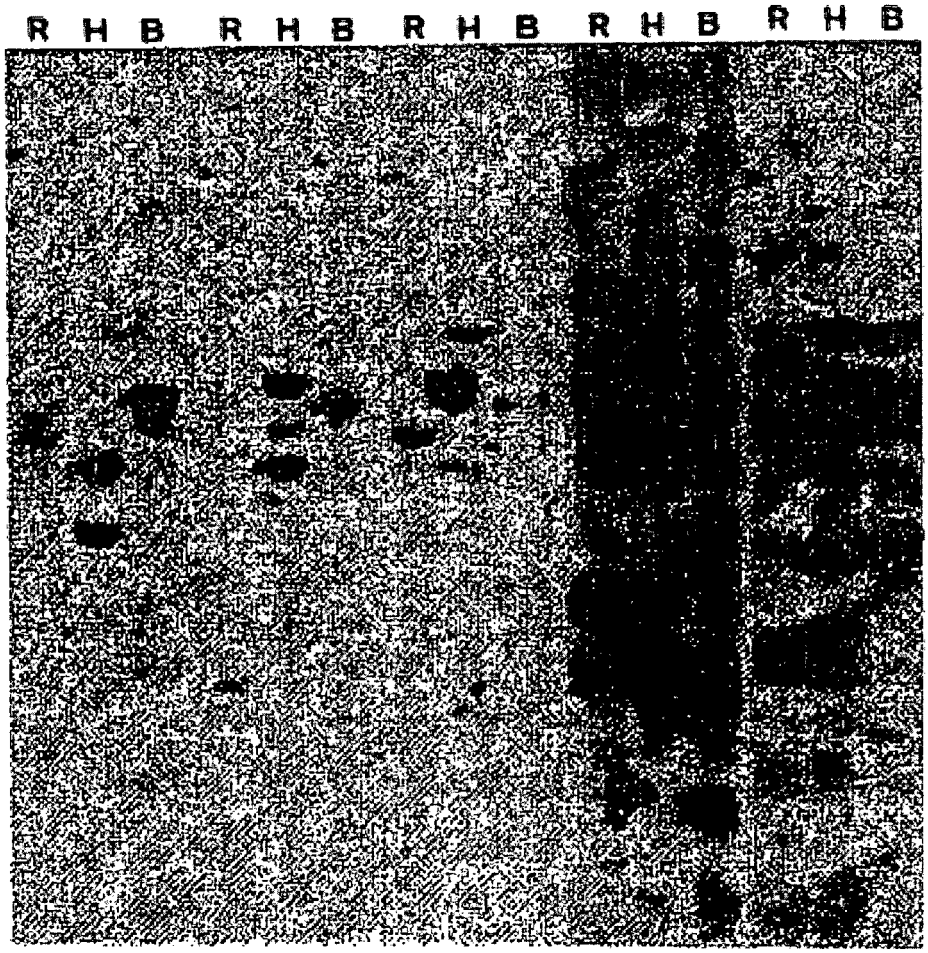

Abb. 3

ERSATZBLATT

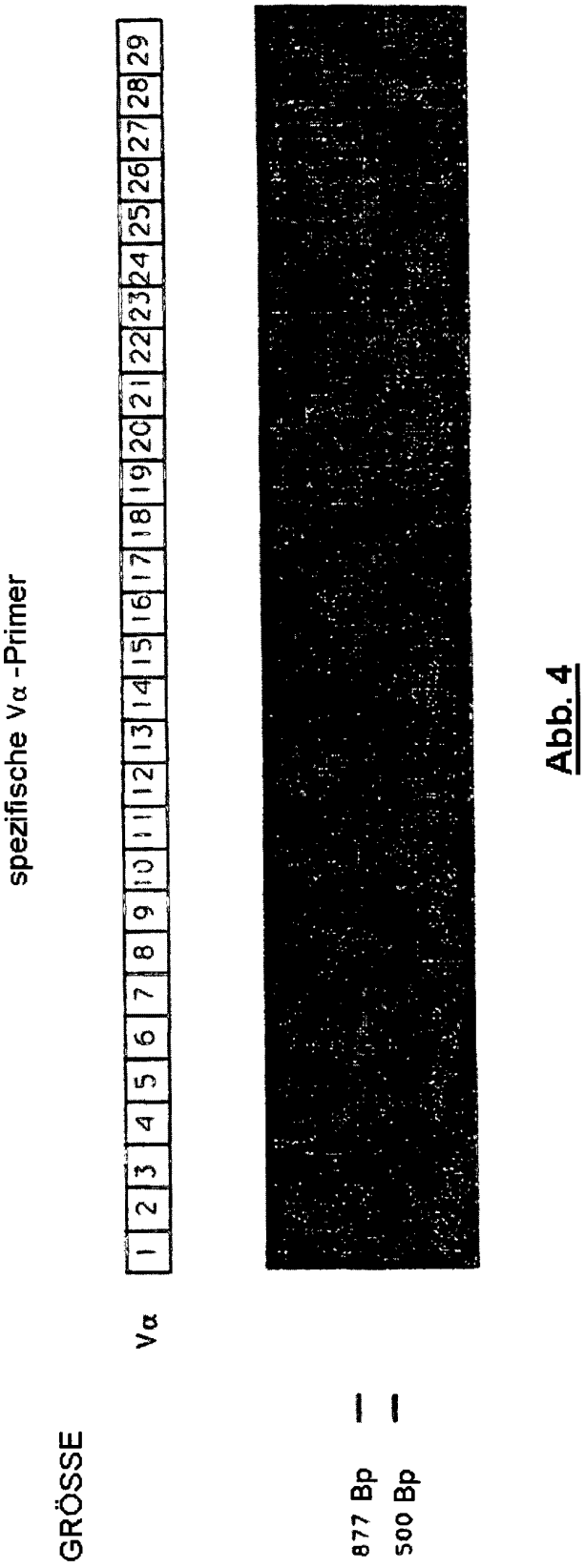
spezifische Vα -Primer
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29
Vα
GRÖSSE
877 Bp
500 Bp

Abb. 4