

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Zelllinien

Die B16 Melanom-Zelllinie ist kaum immunogen und wächst als sehr aggressiver Tumor in C57Bl/6 Mäusen (84). B16 Zellen exprimieren kein MHC-Klasse-II und sehr wenig MHC-Klasse-I, obwohl beide Moleküle nach Behandlung mit IFN $\gamma$  induzierbar sind (85). Die Ova- und gp33-transfizierten B16.F0 und B16.F10 Melanom-Zelllinien (B16-ova und B16-gp33) (86-90) wurden uns von R. Dutton (Trudeau Institute, Saranac Lake, NY, USA) bzw. H. Pircher (Universitätsklinikum Freiburg, D) zur Verfügung gestellt. B16-ova Zellen sezernieren Ova-Protein als tumorspezifisches Surrogatantigen (88). B16-gp33 Zellen exprimieren das LCMV gp33-Minigen als tumorspezifisches Surrogatantigen (90). B16-ova und B16-gp33 Zellen haben genetisch C57Bl/6 Hintergrund und wurden als adhärenente Zelllinie in DMEM mit 10% FCS, 100 U/ml Penizillin/Streptomycin und 1 mg/ml G418 kultiviert. Der aus der Subklonierung von B16-gp33 Zellen hervorgegangene Klon 25 induzierte im Vergleich zu anderen B16-gp33 Klonen die stärkste IFN $\gamma$ -Produktion in naiven P14 T-Zellen (durchschnittlich 40% IFN $\gamma$ /CD8<sup>+</sup>, Daten nicht gezeigt). Die 100% minimale tumorogene Dosis der B16-ova und B16-gp33 Zellen betrug  $5 \times 10^4$ , die der B16-gp33 (Klon 25) Zellen  $4 \times 10^5$ .

Die ekotrope Verpackungszelllinie GP+E86 (91) wurde uns von A. Bank (Columbia Universität, NY, USA) zur Verfügung gestellt. GP+E86 Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS als adhärenente Zelllinie kultiviert. Um GP+E86 Zellen auf die Anwesenheit des gag-pol-Plasmids zu selektionieren, wurden sie in DMEM mit 10% dialysiertem FCS in Anwesenheit von 15  $\mu$ g/ml Hypoxanthin, 250  $\mu$ g/ml Xanthin und 25  $\mu$ g/ml Mycophenolsäure kultiviert.

Die humane T-Zell-Lymphomlinie Jurkat16 (ATCC TIB 152) wurde in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS, 2 mM Glutamin und 10 mM N-(2-Hydroxyethyl) Piperazine-N'-2-Ethansulfonsäure (Hepes) als Suspensionskultur kultiviert. Die Maus-T-Zell-Lymphomlinie LBRM33 Klon 4A2 (ATCC TIB-155) wurde in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS und 50  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol als Suspensionskultur kultiviert.

#### 4.1.2 Mäuse

P14 (B6.A-(TG)P14LCMV) Mäuse (90, 92) wurden uns von R. Schwartz und E. Majane (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institute of Health, Bethesda,

MD, USA) zur Verfügung gestellt. P14 Mäuse sind transgen für TCR, die das LCMV-Glykoprotein-Peptid gp33-41 in H2-D<sup>b</sup>-restringierter Form erkennen. P14-Zellen exprimieren V $\alpha$ 2 und V $\beta$ 8.1 TCR. C57Bl/6 und Rag1<sup>-/-</sup> (B6.129S7-Rag1<sup>tm1Mom</sup>) Mäuse wurden vom Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) gekauft. Um P14/Rag1<sup>-/-</sup> Mäuse zu generieren, wurden zunächst P14 und Rag1<sup>-/-</sup> Mäuse sowie nachfolgend P14/Rag1<sup>+/-</sup> und Rag1<sup>-/-</sup> Mäuse untereinander verpaart. OT-I/Rag1<sup>-/-</sup> Mäuse (89, 93) exprimieren einen transgenen TCR (V $\alpha$ 2, V $\beta$ 5.1), der für das H2-K<sup>b</sup>-restringierte Hühnerovalbuminpeptid ova257-264 spezifisch ist. OT-I und P14 Mäuse (beide Rag1<sup>-/-</sup> und H2<sup>b</sup>) wurden miteinander verpaart, um OT-I/P14 Dtg Mäuse zu generieren. F1 Dtg Mäuse wurden nachfolgend mit P14, OT-I oder Dtg Mäusen (alle Rag1<sup>-/-</sup>) verpaart.

OT-I $\beta$ -transgene Mäuse (94) wurden uns von D. Mathis (Joslin Diabetes Center, Brigham und Harvard Medical School, Boston, USA) zur Verfügung gestellt. Diese Mäuse sind transgen für die  $\beta$ -Kette des OT-I TCR. Um OT-I $\beta$ /Rag1<sup>-/-</sup> Mäuse zu generieren, wurden zunächst OT-I $\beta$  und Rag1<sup>-/-</sup> Mäuse sowie nachfolgend OT-I $\beta$ /Rag1<sup>+/-</sup> und Rag1<sup>-/-</sup> Mäuse untereinander verpaart. P14/Rag1<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit OT-I $\beta$ /Rag1<sup>-/-</sup> Mäusen untereinander verpaart, um P14/OT-I $\beta$ /Rag1<sup>-/-</sup> (P14/OT-I $\beta$ ) Mäuse zu generieren.

RIP-Ova<sup>lo</sup> (95, 96) und RIP-mOva Mäuse (97, 98) wurden uns von T. Brocker, H. Lauterbach und M. Cannarile (Institut für Immunologie, München, D) zur Verfügung gestellt. RIP-Ova<sup>lo</sup> Mäuse exprimieren geringe Mengen Ovalbumin unter der Kontrolle des Ratteninsulin-Promotors (RIP) in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas. RIP-mOva Mäuse exprimieren die membrangebundene Form von Ovalbumin unter Kontrolle des RIP-Promotors in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas, den proximalen Tubuluszellen der Niere sowie sehr geringe Mengen im Thymus (98).

Alle in dieser Arbeit untersuchten Mäuse hatten genetisch C57Bl/6 Hintergrund. RIP-mOva Mäuse wurden auf C57Bl/6 genetischen Hintergrund zurückgekreuzt (N8).

### **4.1.3 Peptide**

Das Hühnerovalbuminpeptid ova257-264 (SIINFEKL), das LCMV-Glykoprotein-Peptid gp33-41 (KAVYNFATM) und das K<sup>b</sup>-bindende Kontrollpeptid SIYRYGGL (SIY) (99) wurden HPLC-gereinigt (Biosynthan, Berlin, D). Die lyophilisierten Peptide wurden in 100  $\mu$ l

Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in Phosphat-gepufferter Saline (PBS) verdünnt, um eine 1 mM Lösung herzustellen. Diese wurde sterilfiltriert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 4.1.4 Oligonukleotide (*Primer*)

Oligonukleotide wurden von der Firma TIB Molbiol (Berlin, D) hergestellt.

P14jax:

5' P14jax: 5'-CAT GGA GGC TGC AGT CAC CC-3'

3' P14jax: 5'-GTT TGT TTG CAA TCT CTG CTT TTG ATG GCT C-3'

Amplikon: 415 bp

V□2:

5' V□2 (S, Bam): 5'-CGC GGA TCC GCG CTA GGA GGA ATG GAC AAG-3'

3' C□(AS, Eco): 5'-CCG GAA TTC CGG TCA ACT GGA CCA CAG CC-3'

Amplikon: 830 bp

V□5:

5' V□5: 5'-AAG GTG GAG AGA GAC AAA GGA-3'

3' V□5: 5'-CCA GTG CAT GCA TAC CTC AG-3'

Amplikon: 470 bp

Ova:

5' ova: 5'-CAA GCA CAT CGC AAC CA-3'

3' ova: 5'-GCA ATT GCC TTG TCA GCA T-3'

Amplikon: 480 bp

P14□ (präparativ):

P14□ (S, NotI-10): 5'-TTT GCG GCC GC AGT CTA GGA GGA ATG GAC AAG-3'

P14□ (AS, EcoR I): 5'-CCG GAATTC TCA ACT GGA CCA CAG CCT CAG-3'

Amplikon: 856 bp

P14□ (präparativ):

P14□ (S, NotI-10): 5'-TTT GCG GCC GC CTG AGA GGA AGC ATG TCT AAC-3'

P14□ (AS, EcoR I): 5'-CCG GAATTC TCA GGA ATT TTT TTT CTT GAC C-3'

Amplikon: 973 bp

□-Aktin:

U12: 5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA CTA CAT-3'

U13: 5'-AAA CGC AGC TCA GTA ACA GTC GCG CTA GAA-3'

Amplikon: 347 bp

*Random Primer* (Invitrogen)

#### 4.1.5 Reagenzien

**Tab. 2: Verwendete Reagenzien**

Chemikalien	Abkürzung	Hersteller
1-kb-DNA-Leiter	M	Invitrogen, Karlsruhe, D
2-Mercaptoethanol	ME	Merck, Darmstadt, D
5-(6)-Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidylester	CFSE	Molecular Probes, Göttingen, D
Agarose		Serva, Heidelberg, D
Alpha modifiziertes Eagle Medium	Alpha-MEM	Gibco, Karlsruhe, D
Ammoniumchlorid	NH <sub>4</sub> Cl	Merck, Darmstadt, D
Ampizillin (50 µg/µl)		Sigma, Taufkirchen, D
Borgallösung (24%)		Intervet, Unterschleißheim, D
Chloroform		Roth, Karlsruhe, D
Desoxy-Nukleotid-Triphosphate	dNTP's	Roche, Mannheim, D
Diethylether		Otto Fischar, Apotheke, Berlin, D
Diethylpyrokarbonat	DEPC	Fluka, Taufkirchen, D
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma, Taufkirchen, D
Dithiothreitol	DTT	Merck, Darmstadt, D
DNase I (Rnase-frei)		Roche, Mannheim, D
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	D-MEM	Gibco, Karlsruhe, D
Dulbecco's PBS (1x)	DPBS	Invitrogen, Karlsruhe, D
Ethanol		Merck, Darmstadt, D
Ethidiumbromid		Serva, Heidelberg, D
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA	Merck, Darmstadt, D
Fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert)	FCS	Greiner, Solingen, D
Geneticin	G418	Gibco, Karlsruhe, D
Glutamin	Glu	Gibco, Karlsruhe, D
Glyzerin		Merck, Darmstadt, D
GolgiPlug		Becton Dickinson, Heidelberg, D
Hefeextrakt		Roth, Karlsruhe, D
Histoacryl		B/Braun, Melsungen, D
Hypoxanthin		Sigma, Taufkirchen, D
Interleukin-2	IL-2	Roche, Mannheim, D
Isoamylalkohol		Merck, Darmstadt, D
Isopropanol		Roth, Karlsruhe, D
Kaliumchlorid	KCl	Merck, Darmstadt, D
Kaliumhydrogenkarbonat	KHCO <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid	MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt, D
Magnesiumsulfat	MgSO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, D
Mycophenolsäure		Sigma, Taufkirchen, D
N-(2-Hydroxyethyl) Piperazine-N'-2-Ethansulfonsäure	Hepes	Serva, Heidelberg, D
Natriumazetat		Fluka, Taufkirchen, D
Natriumchlorid	NaCl	Fluka, Taufkirchen, D

Natriumcitrat		Sigma, Taufkirchen, D
Natriumdodecylsulfat	SDS	Serva, Heidelberg, D
Natriumhydroxid	NaOH	Merck, Darmstadt, D
Natriumpyruvat		Gibco, Karlsruhe, D
Orange G (Ladepuffer)		Merck, Darmstadt, D
Penizillin/Streptomycin	P/S	Gibco, Karlsruhe, D
Perm/Wash Puffer		Becton Dickinson, Heidelberg, D
Pfu DNA Polymerase		Stratagene, Amsterdam, NL
Pfu DNA Polymerase-Puffer		Stratagene, Amsterdam, NL
PharM Lyse		Becton Dickinson, Heidelberg, D
Phenol		Gibco, Karlsruhe, D
Phenol/Chloroform (1:1)		Roth, Karlsruhe, D
Phosphat-gepufferte Saline (1x)	PBS	Gibco, Karlsruhe, D
Protaminsulfat		Sigma, Taufkirchen, D
Proteinase K		Roche, Mannheim, D
Restriktionsendonukleasen und -puffer		Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Retronektin		TaKaRa Biomedicals, Apen, D
Reverse Transkriptase (Superscript II)	RT	Invitrogen, Karlsruhe, D
5x First-Strand-Puffer		Invitrogen, Karlsruhe, D
Rinder- (Bovine) Serum-Albumin	BSA	Serva, Heidelberg, D
RNase-Inhibierer		Promega, Mannheim, D
RPMI 1640-Medium		Gibco, Karlsruhe, D
Salzsäure	HCl	Roth, Karlsruhe, D
T4-DNA-Ligase		Promega, Mannheim, D
T4-Ligationspuffer		Promega, Mannheim, D
Taq-Polymerase		Roche, Mannheim, D
Taq-Polymerase-Puffer (10x)		Roche, Mannheim, D
Tris (hydroxymethyl) aminomethan	Tris	Sigma, Taufkirchen, D
Tris-HCL	Tris-HCl	Sigma, Taufkirchen, D
Triton X-100		Serva, Heidelberg, D
Trypsin		Gibco, Karlsruhe, D
Trypton		Roth, Karlsruhe, D
WLneo		Stratagene, Amsterdam, NL
Xanthin		Sigma, Taufkirchen, D
Zytofix/Zytoperm		Becton Dickinson, Heidelberg, D
Zytoperm- (Saponin-) Puffer		Becton Dickinson, Heidelberg, D

#### 4.1.6 Versuchssysteme (Kits)

**Tab. 3: Kits**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
Cell line Nucleofector V Kit	Amaxa, Köln, D
C-type-RT Activity Assay	Cavidi Tech, Uppsala, S
Gel-Extraktions-Kit	Qiagen, Hilden, D

High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Mannheim, D
Mammalien Transfection Kit	Stratagene, Amsterdam, NL
Plasmid-Mini- bzw. Plasmid-Maxi-Präparationskit	Qiagen, Hilden, D
RNA-Isolationskit ( <i>Rneasy</i> -Mini-Kit)	Qiagen, Hilden, D

#### 4.1.7 Puffer und Lösungen

**Tab. 4: Verwendete Puffer und Lösungen**

Puffer	Zusammensetzung
Chloroform/Isoamylalkohol:	Chloroform (29 ml), Isoamylalkohol (1 ml)
Diethylpyrokarbonat-(DEPC-) Wasser:	500 $\mu$ l DEPC ad 500 ml Aqua dest.
Ethidiumbromid:	10 mg Ethidiumbromid/ml A.dest
LB-Medium:	10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton ad 1 l Aqua dest.
Lysepuffer für Milzzellen:	0,15 M $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 mM $\text{KHCO}_3$ , 0,1 mM $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH 7,2
Lysepuffer für Mausschwanzbiopsate:	100 mM TrisHCl, pH 8,5; 5 mM EDTA, pH 8,0; 0,2% SDS, 200 mM NaCl
OrangeG/Glyzerin:	0,5% Orange G, 25 mM EDTA, 50% Glyzerin
SOC-Medium:	2% Bacto-Trypton, 0,5% Bacto Hefe Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl-Lösung, 10 mM $\text{MgCl}_2$ , 10 mM $\text{MgSO}_4$ , 20 mM Glukose
TAE (50x):	242 g Tris, 57,1 ml konz. Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8, ad 1 l $\text{H}_2\text{O}$

#### 4.1.8 Antikörper

**Tab. 5: Verwendete Antikörper (PharMingen, Heidelberg, D)**

monoklonaler Antikörper	konjugiert mit	Isotyp
Anti-Maus-B220	Pe	Rat IgG <sub>2a</sub> , $\square$
Anti-Maus-CD16/CD32	-	Rat IgG <sub>2b</sub> , $\square$
Anti-Maus-CD3 $\square$	Apc	Hamster IgG <sub>1</sub> , $\square$
Anti-Maus-CD4	Apc, Pe	Ratte IgG <sub>2a</sub> , $\square$
Anti-Maus-CD8	Apc, Pe, Fitc	Ratte IgG <sub>2a</sub> , $\square$
Anti-Maus-V $\square$ 2	Fitc, Pe	Ratte IgG <sub>2a</sub> , $\square$
Anti-Maus-V $\square$ 5.1	Fitc	Maus IgG <sub>1</sub> , $\square$
Anti-Maus-V $\square$ 8.1, 8.2	Pe	Maus IgG <sub>2a</sub> , $\square$
Anti-Maus-IFN $\square$	Apc	Rat IgG <sub>1</sub>
Maus IgG <sub>1</sub> , $\square$ (Isotypstandard)	Fitc	Maus IgG <sub>1</sub> , $\square$
Ratte IgG <sub>2a</sub> , $\square$ (Isotypstandard)	Fitc, Pe	Ratte IgG <sub>2a</sub> , $\square$
Ratte IgG <sub>2a</sub> , $\square$ (Isotypstandard)	Apc, Pe, Fitc	Ratte IgG <sub>2a</sub> , $\square$
Hamster IgG <sub>1</sub> , $\square$ (Isotypstandard)	Apc	Hamster IgG <sub>1</sub> , $\square$
Maus IgG <sub>2a</sub> , $\square$ (Isotypstandard)	Pe	Maus IgG <sub>2a</sub> , $\square$
Ratte IgG <sub>1</sub> (Isotypstandard)	Apc	Ratte IgG <sub>1</sub> , $\square$

#### 4.1.9 Rekombinante MHC-Tetramere

**Tab. 6: Verwendete Tetramere (ProImmune, Oxford, UK)**

Rekombinantes MHC-Tetramer	konjugiert mit
H2D <sup>b</sup> /KAVYNFATM	Apc
H2-K <sup>b</sup> /SIINFEKL	Pe

#### 4.1.10 Verbrauchsmaterialien

**Tab. 7: Verwendete Materialien**

Artikel	Hersteller
24-Loch-Zellkulturplatten (BSA-beschichtet)	Costar, Bodenheim, D
24-Loch-Zellkulturplatten (unbeschichtet)	BD-Falcon, Heidelberg, D
96-Loch-Zellkulturplatten mit Flach- oder Rundboden (BSA-beschichtet)	Costar, Bodenheim, D
DFZ-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden, D
Einmal-Kantülen (0,8x40 bzw. 0,4x20 mm)	Sanimed, Berlin, D
Einmalküvetten	Roth, Karlsruhe, D
Einmalspritzen 25 ml, 10 ml, 5 ml, 1 ml	Braun, Melsungen, D
Eppendorfgeläße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Filter (0,2 µm, 0,45 µm)	Schleicher & Schüll, Dassel, D
Gewebekulturschalen (10 cm Durchmesser)	Greiner, Solingen, D
Glucometer Elite Sensoren	Bayer, Leverkusen, D
Petrischalen (10 cm Durchmesser)	Greiner, Solingen, D
Pinzetten	Roth, Karlsruhe, D
Pipettenspitzen	Roth, Karlsruhe, D
PP-Tube (5 ml)	Greiner, Solingen, D
Präzisionsküvetten aus Quarzglas	Hellma, Müllheim, Baden, D
Scheren	Roth, Karlsruhe, D
Siebe (40 µm)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Skalpell	NeoLab, Heidelberg, D
Sterile Einmalpipetten (5, 10, 25 ml),	Costar, Bodenheim, D
Sterile Pasteurpipetten aus Glas	Brand, Wertheim, D
Zellkulturflaschen (T-25, T-75, T-150)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturrollerflaschen	Costar, Bodenheim, D
Zentrifugenbecher (15 ml, 50 ml)	BD-Falcon, Heidelberg, D

#### 4.1.11 Geräte

**Tab. 8: Verwendete Geräte**

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen, D
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Bio-Rad, München, D
Elektroporationsgerät	Amaxa, Köln, D
ELISA Reader MR 5000	Dynatech, Burlington, USA

Elite Blutzuckermeßgerät	Bayer, Leverkusen, D
FACSCalibur Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg, D
FACS-Gerät EPICS XL2, Partikelzähler	Coulter, Krefeld, D
Feuchtbrutschrank	Labotect, Göttingen, D
Bio-Freezer (-80°C)	Forma Scientific, Cotech, Berlin, D
Gene Ray UV-Photometer	Biometra, Göttingen, D
Lysegerät	Coulter, Krefeld, D oder Becton Dickinson, Heidelberg, D
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen, D
Mikroskop Leitz DM IL	Leica, Wetzlar, D
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe, D
Messschieber	Mitutoyo, Neuss, D
Partikelzähler	Coulter, Krefeld, D
PCR-Gerät	Biometra, Göttingen, D
pH Meter	HANNA Instruments, Kehl/Rhein, D
Pipetten (einfach oder Mehrkanal)	Eppendorf, Hamburg, D
Rollerapparatur	Integra Bio Science, Fernwald, D
Spektrophotometer UV-160A	Shimadzu, Berlin, D
Sterilbank	BDK, Sonnstuhl, D
Stickstofftank CHRONOS	Messer Griesheim, Griesheim, D
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, D
Ultrazentrifuge	Beckmann, Krefeld, D
UV-Tisch	Appligene, Illkirch, D
Vakuumzentrifuge	Savant, Rockville, USA
Vortexer	Janke&Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen, D
Wasserbad	GFL, Burgwedel, D
Zentrifuge 3K12	Sigma, Taufkirchen, D
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge RT 6000D	Sorvall, Langenselbold, D



## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Zellkultur**

#### *4.2.1.1 Inkubation*

Alle Zellkulturen wurden in einem mit 5% CO<sub>2</sub> begasten Feuchtbrutschrank bei 37°C inkubiert. Als Kulturgefäße dienten Zellkultur-Kunststoffflaschen.

#### *4.2.1.2 Bestimmen der Zellzahl*

Die Zellzahl wurde mit der Neubauer-Zählkammer oder einem Partikelzähler (Coulter) bestimmt.

#### *4.2.1.3 Adhärente Zellkulturen*

Monolayer-Zellkulturen wurden in Abhängigkeit von ihrer Proliferationsrate mit neuem Medium versorgt bzw. passagiert. Zur Passage wurde das Kulturmedium abgesaugt und der Zellrasen kurz mit 2 ml 0,3% Trypsin/2,7 mM EDTA in PBS überspült. Nach etwa 5 min Inkubation bei 37°C hatten sich die Zellen abgelöst. Sie wurden in Kulturmedium resuspendiert.

#### *4.2.1.4 Suspensionszellkulturen*

Suspensionskulturen wurden in Abhängigkeit von ihrer Proliferationsrate mit neuem Medium versorgt. Um das Medium zu wechseln, wurden die Zellen zunächst zentrifugiert (5 min Zentrifugation bei 200 x g) und anschließend in neuem Medium aufgenommen.

#### *4.2.1.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen*

Zum Einfrieren wurden Zellen einer zu 80% bewachsenen T-75-Zellkulturflasche zunächst trypsiniert, durch Zentrifugation bei 200 x g pelletiert, anschließend in 2 ml Medium, dem 10% DMSO und 10% FCS zugegeben wurde, resuspendiert und in Aliquoten von 0,5 ml in Einfrierröhrchen langsam auf -80°C heruntergekühlt. Primäre T-Zellen wurden in FCS mit 10% DMSO eingefroren. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff langzeitgelagert. Tiefgefrorene Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in 5 ml Medium aufgenommen.

## 4.2.2 Konstruktion retroviraler P14-TCR $\alpha$ - bzw. TCR $\beta$ -Expressionsvektoren

### 4.2.2.1 Präparative Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifikation der P14 TCR $\alpha$ - und P14 TCR $\beta$ -Kettengene dienten die Plasmide P14 $\alpha$ 2AR bzw. P14 $\beta$ 28AR, die von H. Pircher (Universitätsklinikum Freiburg, D) zur Verfügung gestellt wurden, als Matrize. Die P14 $\alpha$ - bzw. P14 $\beta$ -DNA wurde mit den Primerpaaren P14 $\alpha$  (präparativ) und P14 $\beta$  (präparativ) amplifiziert (Tab. 9). Die Primerpaare wurden so gewählt, dass die entstehenden DNA-Fragmente 5'NotI und 3'EcoRI Erkennungssequenzen trugen (Abb. 8). Die P14 $\alpha$ - und P14 $\beta$ -PCR wurde unter folgenden Konditionen durchgeführt: 3 min bei 94°C, 35 Zyklen von 1,5 min bei 94°C, 1 min bei 70°C, 1 min bei 72°C, gefolgt von einem letzten Elongationsschritt für 10 min bei 72°C. Anschließend wurde die Polymerase durch 30-minütige Inkubation der Probe mit 120  $\mu$ g/500  $\mu$ l Proteinase K bei 37°C verdaut. Die Fragmente wurden mit Hilfe des *High Pure PCR Product Purification Kits* (Roche) nach Angaben des Herstellers gereinigt und in einem Volumen von 60  $\mu$ l *Aqua bidest.* aufgenommen.

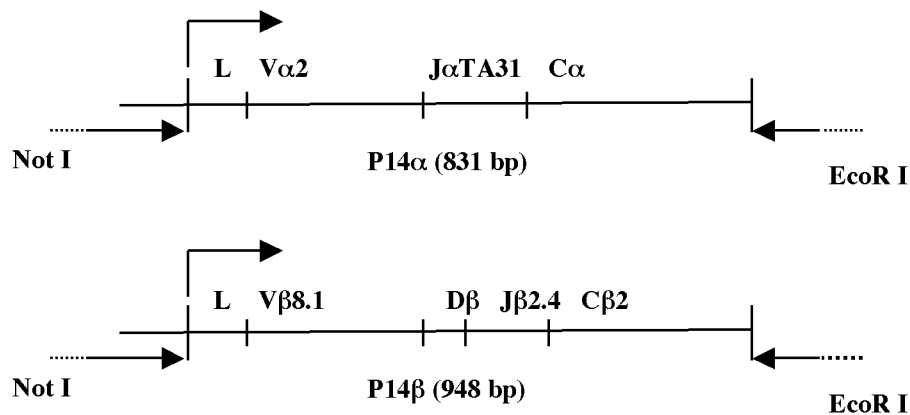
**Tab. 9: Präparativer PCR-Reaktionsansatz:**

Plasmid-DNA	10 $\mu$ l (10 $\mu$ g)
dNTPs	0,4 $\mu$ mol
Primer 1	200 pmol
Primer 2	200 pmol
10xPCR-Puffer	50 $\mu$ l
Pfu-Polymerase	12,5 U
<i>Aqua bidest.</i>	ad 510 $\mu$ l

### 4.2.2.2 Präparativer Restriktionsverdau

Für die Klonierung der P14 TCR $\alpha$ - bzw. TCR $\beta$ -Ketten cDNA wurden diese mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NotI* für 2h bei 37°C verdaut (Tab. 10). Die Fragmente wurden mit Hilfe des *High Pure PCR Product Purification Kits* (Roche) nach Angaben des Herstellers gereinigt und in einem Volumen von 35  $\mu$ l *Aqua bidest.* aufgenommen. Zur Überprüfung der Fragmentgröße und Abschätzung der DNA-Konzentration wurden 4  $\mu$ l der Probe auf einem 1%-igen Agarose-Gel aufgetrennt.

Der retrovirale Expressionsvektor MP71-GPRE (17, 100) (Abb. 9) wurde, um das posttranskriptionale regulatorische Element (PRE) zu erhalten, partiell mit *EcoRI* und nachfolgend mit *NotI* verdaut (Tab. 11). Der partielle Verdau wurde für 15 min bei 37°C und



**Abb. 8: Präparative PCR zur Amplifikation der P14 TCR $\alpha$ - bzw. TCR $\beta$ -Ketten DNA.** Die Primerpaare zur Amplifikation der P14 TCR $\alpha$ - bzw. P14 TCR $\beta$ -Kettengene enthielten 5'*NotI* und 3'*EcoRI* Erkennungssequenzen und waren so gewählt, dass sie die komplette P14 TCR $\alpha$ - bzw. TCR $\beta$ -Kettensequenz einrahmten.

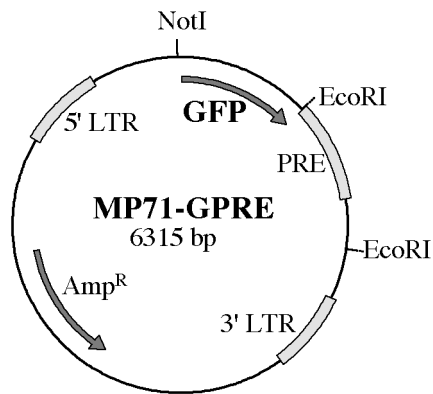
**Tab. 10: Präparativer Restriktionsansatz:**

DNA	30 $\mu$ l
10 x Puffer	3,8 $\mu$ l
<i>EcoRI</i>	20 U
<i>NotI</i>	20 U
<i>Aqua bidest.</i>	ad 38 $\mu$ l

nachfolgend, um das Enzym zu inaktivieren, für 20 min bei 68°C, inkubiert. Die mit Hilfe des *High Pure PCR Product Purification Kits* (Roche) nach Angaben des Herstellers gereinigte DNA wurde mit *NotI* für 2 h bei 37°C verdaut und anschließend für 10 min bei 68°C inkubiert. Nachfolgend wurden die DNA-Fragmente auf einem 1%-igen präparativen Agarose-Gel aufgetrennt. Zur Präparation der DNA-Fragmente wurde die entsprechende DNA-Bande (5,4 kb) unter langwelligem UV-Licht (354 nm) aus dem Agarose-Gel mit Hilfe eines Skalpell herausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert. Die Elution der DNA mittels Gel-Extraktions-Kits (Qiagen) erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die so gereinigte und isolierte DNA konnte direkt für die Ligation eingesetzt werden.

#### 4.2.2.3 DNA-Ligation

Die Ligation der *EcoRI* und *NotI* verdauten P14 TCR $\alpha$ - bzw. TCR $\beta$ -Ketten cDNA in die *EcoRI*- und *NotI*-Restriktionsstellen des retroviralen Expressionsvektors MP71-PRE (MP71) erfolgte durch 15-minütige Inkubation in Anwesenheit von 1/2 Volumen 2x Ligationspuffer



**Abb. 9: Schematische Darstellung des retroviralen GFP-kodierenden MP71-Vektorkonstrukts.** Amp<sup>R</sup>, Ampizillinresistenz; GFP, grün fluoreszierendes Protein; LTR, lange endständige Wiederholungssequenz des Myeloproliferativen Sarcomavirus; PRE, Murmeltier-Hepatitisvirus posttranskriptionales regulatorisches Element.

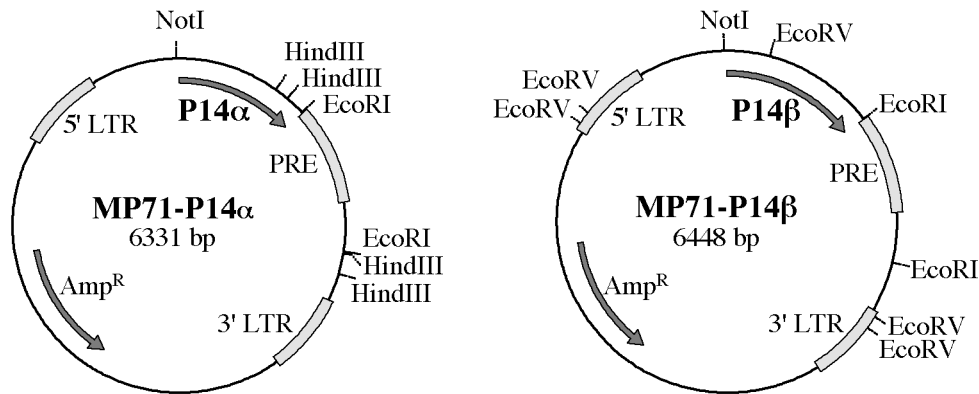
**Tab. 11: Präparativer Restriktionsansatz:**

	<i>EcoRI</i> (partiell)	<i>NotI</i>
DNA	5 $\mu$ l (8 $\mu$ g)	41 $\mu$ l
10 x Puffer	2 $\mu$ l	6 $\mu$ l
Enzym	6 U	20 U
BSA	-	6
Triton	-	6
<i>Aqua bidest.</i>	ad 100 $\mu$ l	ad 61 $\mu$ l

und 3 Units T4-DNA-Ligase in einem Reaktionsvolumen von 10  $\mu$ l bei Raumtemperatur. Die T4 DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen den 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen doppelsträngiger DNA.

#### 4.2.2.4 Transformation von *E.coli* DH5 $\alpha$ -Zellen

*E.coli*-DH5 $\alpha$ -Zellen wurden mit den MP71-P14 $\alpha$  bzw. MP71-P14 $\beta$  Konstrukten (Abb. 10) transformiert. Dazu wurden 100  $\mu$ l chemisch kompetente *E.coli* Zellen (101) mit ca. 200 ng Plasmid-DNA vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 60 s Hitzeschock bei 42°C und anschließender Abkühlung auf Eis wurde der Ansatz mit 900  $\mu$ l SOC-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der Transformationsansatz wurde anschließend in Selektionsmedium (LB-Medium mit 50  $\mu$ g/ml Ampizillin) auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Rekombinante Plasmide wurden mittels Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA überprüft (Tab. 12).



**Abb. 10: Schematische Darstellung der retroviralen P14 $\alpha$ - bzw. P14 $\beta$ -kodierenden MP71-Vektorkonstrukte.** Amp<sup>R</sup>, Ampizillinresistenz; LTR, lange endständige Wiederholungssequenz des Myeloproliferativen Sarcomavirus; PRE, Murmeltier-Hepatitisvirus posttranskriptionales regulatorisches Element.

**Tab. 12: Fragmentgrößen nach Restriktionsverdau der retroviralen Expressionsvektoren:**

Plasmid	Enzym	erhaltene Fragmentgrößen (bp)
MP71-P14 $\alpha$	HindIII	87, 125, 1039, 5080
	EcoRI/NotI	850, 906, 4575
MP71-P14 $\beta$	EcoRI/NotI	906, 967, 4575
	EcoRV	75, 75, 1191, 1933, 3174

#### 4.2.2.5 Plasmidpräparation

Die Präparation von Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Plasmid-Mini- bzw. Plasmid-Maxi-Präparationskits (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Plasmid-Mini-Präparation wurden 5 ml einer Übernachtskultur von Plasmid-transformierten *E. coli* DH5 $\alpha$  eingesetzt. Größere Mengen von Plasmid-DNA (Plasmid-Maxi-Präparation) wurden aus einer 200 ml Übernachtskultur von Plasmid-transformierten *E. coli* DH5 $\alpha$  präpariert.

#### 4.2.2.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenz der P14 TCR $\alpha$ - bzw. P14 TCR $\beta$ -Ketten-DNA-Fragmente der MP71-P14 $\alpha$  bzw. MP71-P14 $\beta$  Vektoren wurde mit Hilfe der Didesoxynukleotid-Sequenzierung unter Anwendung von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden überprüft (Invitek, Berlin, D).

### 4.2.3 *In vitro Experimente*

#### 4.2.3.1 *Nukleofektion*

Um zu überprüfen, ob die generierten Vektoren MP71-P14 $\square$  bzw. MP71-P14 $\square$  die P14 $\square$ - bzw. P14 $\square$ -Ketten zur Expression bringen können, wurden die Plasmide transient mittels Nukleofektion in humane Jurkat- bzw. Maus-LBRM33-Zellen transfiziert. Dazu wurden  $3,5 \times 10^6$  Zellen in PBS gewaschen und anschließend in 100  $\mu$ l *Cell line Nucleofector Kit V*-Lösung (Amaxa) aufgenommen. Nach Zugabe von je 4  $\mu$ g P14 $\square$ - und P14 $\square$ -DNA wurde die Elektroporation an dem Elektroporationsgerät (Amaxa) mit Programm S18 durchgeführt. Nach 4 Tagen wurde die P14-TCR-Expression nach Färbung mit mAK, die gegen V $\square$ 2 oder V $\square$ 8 gerichtet waren, bzw. nach Färbung mit den Tetrameren D<sup>b</sup>/gp33, mittels DFZ untersucht.

#### 4.2.3.2 *Generierung stabiler Retrovirus-Produzenten-Zelllinien*

Zur Generierung stabiler Retrovirusvektorpartikel-Produzenten, wurde die Verpackungszelllinie GP+E86 mit den retroviralen Expressionsvektoren MP71-P14 $\square$  bzw. MP71-P14 $\square$  und dem Plasmid WLneo (Stratagene) mittels CaPO<sub>4</sub>-Präzipitation (*Mammalian Transfection Kit*, Stratagene) nach Angaben des Herstellers kotransfiziert. Aus Klonen, welche die Selektion mit 1,5 mg/ml G418 überlebten, wurde RNA isoliert, die nachfolgend in cDNA umgeschrieben wurde. Mittels PCR wurde überprüft, ob die P14 $\square$ - bzw. P14 $\square$ -Gene transkribiert wurden. Die P14 $\square$ - bzw. P14 $\square$ -exprimierenden GP+E86-Klone wurden nachfolgend für die Herstellung von Retrovirusvektorpartikel-haltigen Zellkulturüberständen (Virus-ZKÜ) verwendet.

#### 4.2.3.3 *Herstellung von Virus-ZKÜ*

Verpackungszellen aus drei zu ca. 90% konfluenten T-150 Zellkulturflaschen wurden trypsiniert und in einem Volumen von 150 ml Medium in einer Rollerzellkulturflasche bei 37°C rotierend bei einer Geschwindigkeit von 0,4 Umdrehungen/min (U/min) im Brutschrank kultiviert, bis der Zellrasen zu ca. 90% konfluent war. Um Virus-ZKÜ zu generieren, wurde das Medienvolumen dann auf 45 ml reduziert und die Rotationsgeschwindigkeit auf 1 U/min erhöht. Virus-ZKÜ wurden drei- bis fünfmal im Abstand von 24 h entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Um abgelöste Verpackungszellen aus dem Virus-ZKÜ zu entfernen,

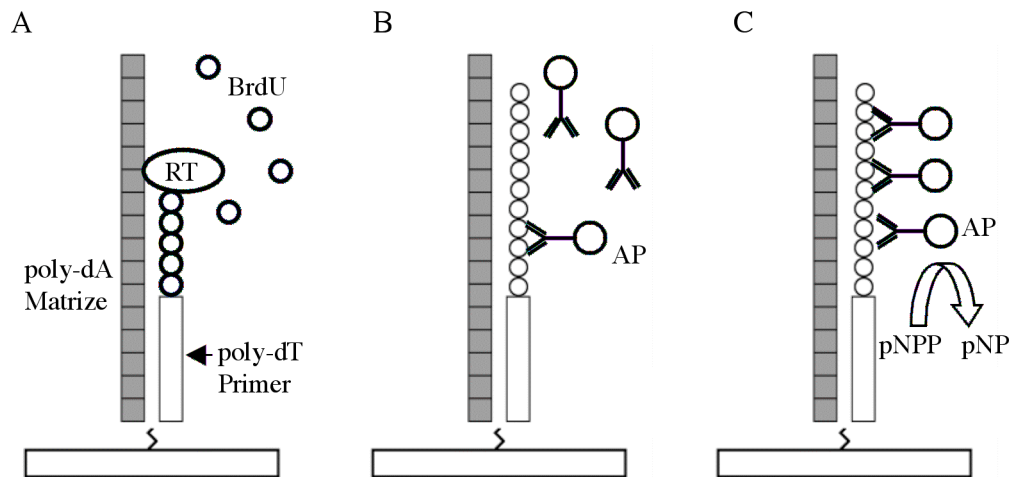
wurde dieser bei 200 x g zentrifugiert und anschließend durch einen 0,45  $\mu\text{m}$  Filter filtriert. Die Virus-ZKÜ wurden in Aliquoten von 3 ml bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Der Titer der Virus-ZKÜ wurde mit Hilfe des *C-type-RT Activity Assay's* (Cavidi Tech) nach Angaben des Herstellers (Protokoll B) und folgendem Prinzip bestimmt. Mit Hilfe des in den Retroviren enthaltenen Enzyms Reverse Transkriptase (RT) und zugegebenen Poly-dT-Primern wurde in Anwesenheit von Brom-Desoxyuridin-Triphosphat (BrdU) cDNA synthetisiert, deren PolyA-Matrize in den Vertiefungen einer Zellkulturplatte fixiert war (Abb. 11A). Nach Zusatz der mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugierten mAK, die gegen BrdU gerichtet waren (Abb. 11B), wurde die Menge der synthetisierten cDNA durch Zugabe von AP-Substrat (para-Nitrophenyl-Phosphat) anhand der auftretenden Färbung bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch bestimmt (Abb. 11C). Die Menge der synthetisierten cDNA ist proportional zur Revertaseaktivität und korreliert daher annähernd mit dem Virustiter. Die Revertaseaktivität wurde jeweils in 10  $\mu\text{l}$  des logarithmisch zur Basis 10 ( $10^{-1}$  bis  $10^{-3}$ ) verdünnten ZKÜ der Probe bestimmt. Als Referenzen dienten *Moloney-Mausleukämievirus* (M-MLV) ZKÜ mit bekannter RT-Konzentration und ZKÜ mit bekanntem Virustiter.

#### 4.2.3.4 *Retronektin-Beschichtung von Zellkulturplatten*

Retronektin ist das rekombinante humane Fibronektin-Fragment CH-296. Retronektin wurde in *Aqua bidest.* gelöst, sterilfiltriert und in PBS verdünnt. Davon wurden je 0,4 ml (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in die Vertiefungen einer unbeschichteten 24-Loch-Platte gegeben. Nach 2 h Inkubation bei  $24^{\circ}\text{C}$  wurde die Retronektin-Lösung entfernt. Die Vertiefungen wurden anschließend 30 min bei  $24^{\circ}\text{C}$  mit 0,4 ml einer 2%-igen BSA-Lösung inkubiert. Danach wurden die Vertiefungen mit 2 ml Hapes/PBS (25 mM) gewaschen.

#### 4.2.3.5 *Infektion mit Virus-ZKÜ (Transduktion)*

Für 24 h spezifisch mit 1  $\mu\text{M}$  Peptid stimulierte Maus-Milzzellen ( $2 \times 10^5$  T-Zellen/ml/Vertiefung) wurden in Retronektin-beschichtete 24-Loch-Zellkulturplatten eingesät. Retronektin fördert wahrscheinlich die Kolokalisation der Zellen und der Viruspartikel und erhöht dadurch die Transduktionseffizienz. Je Vertiefung wurden bei Kotransduktion je 0,8 ml virushaltiger ZKÜ, bei Einzeltransduktion 0,8 ml virushaltiger ZKÜ und 0,8 ml Medium, zugegeben. Die Transduktion wurde in Anwesenheit von 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Protaminsulfat durchgeführt. Protaminsulfat ist positiv geladen und neutralisiert dadurch die



**Abb. 11: Prinzip des C-type-RT Activity Assay's (Cavidi Tech).** Die im viralen ZKÜ enthaltene RT synthetisiert in Anwesenheit von BrdU cDNA, deren PolyA-RNA-Matrize an der Innenseite der Platte fixiert ist (A). Nach Zugabe von mit AP konjugierten mAK, die gegen BrdU gerichtet sind (B) lässt sich die Menge der synthetisierten cDNA durch Zugabe des AP-Substrates pNPP anhand der auftretenden Färbung photometrisch bestimmen (C). AP, alkalische Phosphatase; BrdU, Brom-Desoxyuridin-Triphosphat; pNP, para-Nitrophenol; pNPP, para-Nitrophenyl-Phosphat; RT, Reverse Transkriptase.

negativ geladenen Zellmembranen, wodurch den Viren wahrscheinlich der Eintritt in die Zellen erleichtert wird. 24 h nach initialer Stimulation wurden Maus-Milzzellen erneut mit  $1 \mu\text{M}$  Peptid und  $10 \text{ U/ml}$  IL-2 stimuliert. Die Transduktionseffizienz wurde mittels DFZ 4-5 Tage nach der Transduktion untersucht.

#### 4.2.3.6 Isolierung von Milzzellen aus der Maus

Einzelzellsuspensionen von Maus-Milzzellen wurden mit Lysepuffer behandelt, um die Erythrozyten zu lysieren. Falls nicht anders angegeben, wurden  $2 \times 10^6$  Milzzellen/ml in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS,  $100 \text{ U/ml}$  Penizillin/Streptomycin,  $2 \text{ mM}$  Glutamin,  $1 \text{ mM}$  Hepes,  $50 \mu\text{M}$  2-Mercaptoethanol und  $1 \text{ mM}$  Natriumpyruvat kultiviert.

#### 4.2.3.7 Stimulation der Milzzellen

Frisch isolierten Milzzellen wurde  $1 \mu\text{M}$  Peptid zur Stimulation der T-Zellen zugegeben. Um die Peptidsensitivität der T-Zellen zu untersuchen, wurden diese in Anwesenheit von verschiedenen Peptidkonzentrationen ( $1$  bis  $10^{-8} \mu\text{M}$ ) inkubiert.



#### 4.2.3.8 Färbung von T-Zellen mit Antikörpern und rekombinanten MHC-Tetrameren

T-Zellen wurden in PBS mit R-Phycoerythrin- (Pe-) und Allophycocyanin- (Apc-) konjugierten mAK (2  $\mu\text{g/ml}$ ), Fluoresceinisothiocyanate- (Fitc-) konjugierten mAK (10  $\mu\text{g/ml}$ ) bzw. Fluorochrom-konjugierten rekombinanten MHC-Tetrameren (1,3  $\mu\text{g/ml}$ ) 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper und Tetramere zu entfernen. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht oder mit Fluorochrom-konjugierten Isotypkontroll-mAK gefärbt waren oder Zellen, von denen bekannt war, dass sie die TCR nicht exprimierten. Die Expression der TCR und Korezeptormoleküle wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

#### 4.2.3.9 Durchflusszytometrie (DFZ)

Mittels DFZ wurden Informationen über Größe und Struktur individueller Zellen gewonnen und die Expression von verschiedenen Oberflächenproteinen qualitativ und quantitativ analysiert. Passiert eine Zelle den Laserstrahl des Durchflusszytometers, wird Licht, dessen Intensität von Struktur und Größe der Zellen abhängt, in alle Richtungen gestreut. Fluoreszenzmoleküle in oder auf der Zelle werden angeregt und emittieren daraufhin Licht, dessen Spektrum molekülabhängig ist. Das gestreute und emittierte Licht wird von Detektoren gesammelt, die das Licht in elektrische Signale umwandeln. Zur Analyse wurden 100-1000  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension (in PBS) in DFZ-Röhrchen überführt. Um Zellmodifikationen zu vermeiden, wurden die Zellen bis zur Messung bei 4°C gelagert. Vor der Messung wurde die Zellsuspension gründlich gemischt, um die darin enthaltenen Zellen zu vereinzeln. Vor Beginn der Analyse wurde die Autofluoreszenz der Zellen ermittelt, wodurch die Sensitivität der Messung für Fitc-, Pe- bzw. Apc-Fluorochrome gewährleistet wurde. Je Messung wurden 1000-100.000 Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Zur Auswertung der Messdaten wurde die Cellquest Pro Software (Becton Dickinson) genutzt. Tote Zellen wurden durch Nutzung der vorderen und seitlichen Lichtstreuungsparameter, die Aussagen über Größe und Granularität der Zellen zulassen, von der Analyse ausgeschlossen.

#### 4.2.3.10 CFSE Proliferationsassay

Um die Zellteilungsrate mittels DFZ zu bestimmen, wurden frisch isolierte Milzzellen vor Peptidstimulation mit 5-(6)-Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidylester (CFSE) markiert. CFSE ist ein fluoreszierender Farbstoff, der mit großer Genauigkeit zwischen den

Tochterzellen aufgeteilt wird und es dadurch erlaubt, jede neue Generation von Tochterzellen mittels DFZ zu identifizieren (102). CFSE ist in seiner ursprünglichen Form membranpermeabel und nicht fluoreszierend. Nach Diffusion in die Zelle wird es so verändert, dass das Molekül stark fluoresziert und die Zellmembranen nicht länger durchdringen kann. Zusätzlich bindet CFSE stabil an intrazelluläre Proteine. Proteine mit langer Halbwertszeit, wie z.B. die des Zytoskeletts, sind für die lange Haltbarkeit der CFSE-Färbung verantwortlich. Um die Zellen mit CFSE zu markieren, wurden die Milzzellen in einer Zellkonzentration von  $1-2 \times 10^7/\text{ml}$  in PBS, dem  $5 \mu\text{M}$  CFSE zugesetzt wurde, resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen. Schließlich wurden  $4 \times 10^5$  Zellen in Anwesenheit von  $1 \mu\text{M}$  Peptid in einem Volumen von  $200 \mu\text{l}$  kultiviert. Nach 72 h wurden die Zellen mit Pe-konjugierten mAK, die gegen CD8 gerichtet waren, gefärbt und mittels DFZ analysiert.

#### 4.2.3.11 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Um die Effektorfunktion von CTL *in vitro* zu analysieren, wurden  $4 \times 10^5$  Milzzellen von einzel-TCR-transgenen (*single-TCR-transgenic*, Stg) oder Dtg Mäusen bzw.  $1 \times 10^6$  Milzzellen von T-Zell-rekonstituierten Rag1<sup>-/-</sup> Mäusen in Anwesenheit von  $1 \mu\text{M}$  Peptid in einem Volumen von  $200 \mu\text{l}$  inkubiert. Nach 24 bzw. 48 h wurde der Kultur  $2,5 \mu\text{g}$  GolgiPlug<sup>TM</sup> (Becton Dickinson), das 10% Brefeldin A enthielt, zugegeben. Brefeldin A blockiert intrazelluläre Transportprozesse und sorgt für die Akkumulation von Zytokinen im rauhen endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi-Apparat. Die Zellen wurden für weitere 4 h in Anwesenheit von Brefeldin A kultiviert. Die Färbung von CD8-Korezeptoren auf der Zelloberfläche und von intrazellulärem IFN $\gamma$  wurde in 96-Lochplatten in einem Volumen von  $100 \mu\text{l}$  durchgeführt. Um unspezifische Bindungen der CD8-mAK zu verhindern, wurden zunächst die Fc-Rezeptoren durch Inkubation mit  $2,5 \mu\text{g}$  Anti-CD16/CD32 Antikörpern in einem Volumen von  $50 \mu\text{l}$  blockiert. Nach 15 min wurden  $0,6 \mu\text{g}$  Pe-konjugierte mAK, die gegen CD8 gerichtet waren, in einem Volumen von  $50 \mu\text{l}$  zugegeben. Nach 10 min wurden die Zellen einmal in  $200 \mu\text{l}$  PBS gewaschen, um ungebundene AK zu entfernen. Damit zytokinspezifische Antikörper die Zellmembran sowie die Membranen des ER und des Golgi-Apparates penetrieren konnten, wurden die Zellen zunächst in  $200 \mu\text{l}$  Zytofix/Zytoperm (Becton Dickinson), das 4% Paraformaldehyd enthielt, für 30 min fixiert. Anschließendes Waschen in  $200 \mu\text{l}$  Saponin-haltigem Zytoperm- Puffer

(Becton Dickinson) führte zur Permeabilisierung der Zellmembranen. Die Fixierung mit Paraformaldehyd erlaubte dabei die Erhaltung der Zellmorphologie und intrazellulären Antigenität. Um intrazelluläres IFN $\gamma$  anzufärben, wurden den Zellen 0,6  $\mu\text{g}$  der Apc-konjugierten Anti-IFN $\gamma$  mAK zugegeben. Die IFN $\gamma$ -Produktion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde mittels DFZ analysiert.

#### 4.2.3.12 Subklonierung von Zellen

Um eine klonale Zellpopulation von B16-gp33 Zellen herzustellen, wurden die Zellen in einer Konzentration von 0,3 Zellen je Vertiefung einer 96-Lochplatte in einem Volumen von 100  $\mu\text{l}$  kultiviert. Diese limitierte Verdünnung führt dazu, dass sich in ca. 30% der Vertiefungen Zellklone vermehren. Die Höhe der gp33-Expression der so gewonnenen Zellklone wurde anhand der Fähigkeit dieser Zellen, die IFN $\gamma$ -Produktion in naiven P14 T-Zellen nach 24 h zu induzieren, untersucht.

### 4.2.4 In vivo Experimente in Mäusen

#### 4.2.4.1 Untersuchung der Mausgenotypen

Das Vorhandensein der P14- und OT-I-TCR-Transgene in peripheren Blutzellen TCR-transgener Mäuse wurde nach Färbung mit mAK, die gegen V $\beta$ 5 bzw. V $\beta$ 8 gerichtet waren, mittels DFZ analysiert. Zusätzlich wurde, wenn angegeben, das Vorhandensein der  $\alpha$ -TCR-Transgene in genomischer DNA der Mäuse mittels PCR bestätigt. Das Vorhandensein des Ova-Transgens in genomischer DNA von RIP-Ova<sup>lo</sup> bzw. RIP-mOva Mäusen wurde mittels PCR untersucht. Die Abwesenheit von B-Zellen in Rag1<sup>-/-</sup> Mäusen wurde nach Färbung mit mAK, die gegen B220 gerichtet waren, mittels DFZ analysiert.

#### 4.2.4.2 Injektion von Tumorzellen

B16-ova und B16-gp33 Zellen wurden trypsiniert und zweimal in Dulbecco's PBS (DPBS) gewaschen. Einzelzellsuspensionen wurden in einem Volumen von 0,2 ml DPBS lateral subkutan (*subcutan, sc.*) in die abdominale Region der Mäuse injiziert. Rag1<sup>-/-</sup> Mäusen wurden 5x10<sup>4</sup> bzw. 1x10<sup>5</sup> B16-ova und B16-gp33 Zellen kontralateral injiziert. C57Bl/6, RipOva<sup>lo</sup> bzw. RipmOva Mäusen wurden 5x10<sup>4</sup> oder 1x10<sup>5</sup> B16-gp33 Zellen bzw. 4x10<sup>5</sup> B16-gp33 (Klon 25) Zellen injiziert. Die Tumorgröße, bestimmt mit einem Messschieber, wurde als Mittelwert der größten Tumordurchmesser im rechten Winkel bestimmt. Die Mäuse

wurden bis zu einer Tumorgroße von 0,5 cm als tumorfrei eingestuft und getötet, wenn die Tumoren eine Größe von max. 1,6 cm erreicht hatten. Zur Bestimmung der 100% minimal tumorigenen Dosis, also der geringsten Tumorzellzahl, die nach subkutaner Injektion in allen Versuchstieren zum Wachstum von Tumoren führt, wurden  $10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $10^5$ ,  $2 \times 10^5$  bzw.  $4 \times 10^5$  Zellen von B16-ova, B16-gp33 bzw. B16-gp33-Klon 25 in Rag1<sup>-/-</sup>, C57Bl/6 bzw. RIP-Ova<sup>lo</sup> Mäuse injiziert.

#### 4.2.4.3 Adoptiver T-Zelltransfer

Um zytotoxische T<sub>E</sub> zu generieren, wurden Milzzellsuspensionen in Anwesenheit von 1  $\mu$ M Peptid in einem Volumen von 25 bis 80 ml kultiviert. Nach 72 h wurden die T<sub>E</sub> zweimal in DPBS gewaschen. Es wurden  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  oder  $10^7$  T<sub>E</sub> in die Schwanzvene von gleichaltrigen und gleichgeschlechtlichen Mäusen, die 24 h zuvor mit Tumorzellen injiziert worden waren, gespritzt.

#### 4.2.4.4 Messung der Blutglukosekonzentration

Die Glukosekonzentration im Blut, entnommen aus der Schwanzvene der Maus, wurde mittels des ELITE Blutzuckermessgerätes (Bayer, Leverkusen, D) ermittelt. Die Sensoren füllen sich aufgrund des Kapillareffektes mit Blut. Die in den Sensoren enthaltene Glukoseoxidase setzt die Blutglukose um, wodurch Elektronen freigesetzt werden. Der dadurch erzeugte elektrische Strom, der proportional zu der Glukosekonzentration der Probe ist, wird gemessen. Der Messbereich des Blutzuckermessgerätes beträgt 1,1 bis 33,3 mM. Mäuse mit einer Blutglukosekonzentration von  $\geq 14$  mM galten als diabetisch.

### 4.2.5 Weitere molekularbiologische Arbeiten

#### 4.2.5.1 RNA-Präparation

Zur Präparation von RNA wurden je  $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  Zellen zweimal in einem Volumen von 5 ml PBS gewaschen und mit Hilfe einer Kanüle (0,9 mm) homogenisiert. Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy-Isolationskits (Quiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA wurde mit 100  $\mu$ l RNase-freiem Wasser (Quiagen) eluiert. Um mögliche kontaminierende genomische DNA zu verdauen, wurde die RNA mit 5  $\mu$ M Tris (pH 7,5), 25 nM MgCl<sub>2</sub>, 20 Units RNase-Inhibierer (Promega) und 10 Units DNase (Roche) gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von einem Volumen Phenol-Chloroform und Zentrifugation bei

8000 x g wurde die RNA-haltige wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Um die RNA zu präzipitieren, wurden die Proben nach Zusatz des fünffachen Volumens Ethanol und 10% Natriumazetat (2M, pH4) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für 20 min inkubiert und anschließend für 10 min bei 13000 x g bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20  $\mu\text{l}$  Diethylpyrokarbonat-(DEPC-) Wasser aufgenommen. Die Konzentration der RNA wurde in einer Verdünnung von 1:250 in Präzisionsküvetten aus Quarzglas spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von 1 entspricht ungefähr 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNA. Um die Reinheit der RNA zu überprüfen, wurde die Messung auch bei 280 nm durchgeführt. Anhand des Quotienten der Messungen bei 260 und 280 nm ließ sich die Reinheit der gewonnenen RNA abschätzen. Ein  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ -Verhältnis von größer als 1,6 deutet auf eine saubere Präparation hin. Die RNA wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 4.2.5.2 Herstellung von cDNA

Für die Herstellung von cDNA wurden 2,5  $\mu\text{g}$  RNA mit 50 pmol *Random*-Primern (Invitrogen) und 10 nmol dNTP-Mix (Roche) ad 10,5  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser für 10 min bei  $70^{\circ}\text{C}$  inkubiert, um das Aufschmelzen doppelsträngiger RNA-Bereiche zu ermöglichen, und anschließend 1 min auf Eis abgekühlt, was zur Anlagerung der Primer führte. Nach Zugabe von 4  $\mu\text{l}$  5x First-Strand-Puffer (Invitrogen), 20 U RNase-Inhibierer (Promega), 0,2  $\mu\text{M}$  Dithiothreitol (Invitrogen) und 200 U *Superscript Revertase II* (Invitrogen) wurde der Ansatz 60 min bei  $42^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Enzyme wurden anschließend durch eine 5-minütige Inkubation bei  $95^{\circ}\text{C}$  inaktiviert. Die cDNA wurde sofort für die PCR-Analyse eingesetzt oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 4.2.5.3 Isolation von genomischer DNA

Genomische DNA der zu untersuchenden Mäuse wurde aus Schwanzbiopsaten von 0,5 cm Länge gewonnen, indem diese zunächst in 100  $\mu\text{l}$  Lysepuffer in Anwesenheit von 25  $\mu\text{g}$  Proteinase K über Nacht bei  $55^{\circ}\text{C}$  im Schüttelbad inkubiert wurden. Nach anschließender 10-minütiger Inkubation bei  $94^{\circ}\text{C}$  wurden 200  $\mu\text{l}$  *Aqua-bidest.* zugefügt. Für die PCR wurden 2,5  $\mu\text{l}$  der DNA-Lösung eingesetzt.

#### 4.2.5.4 PCR

Die PCR ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Amplifikation von DNA-Abschnitten. Für die PCR wurden ein Überschuss an Oligonukleotidprimern, die mit jeweils einem der DNA-Stränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts hybridisieren, eine ausreichende Menge der vier Desoxynukleosidtriphosphate und eine hitzebeständige DNA-Polymerase benötigt. Um die DNA-Doppelhelix in Einzelstränge zu trennen, wurde der Ansatz auf ca. 95°C erhitzt. Um die Hybridisierung der Primer (Annealing) zu ermöglichen, wurde die Temperatur in Abhängigkeit von der Hybridisierungstemperatur der Primer abgesenkt. Von dem durch die Anlagerung der Oligonukleotide entstandenen doppelsträngigen Bereich ausgehend wurden nun in beide Richtungen komplementäre DNA-Stränge synthetisiert (Elongation). Durch das zyklische Erhitzen und Abkühlen wiederholt sich die Reaktionsfolge aus DNA-Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation, woraufhin es nach jedem Reaktionsschritt zu einer Verdopplung der DNA und damit in einer Kettenreaktion zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung der durch die Oligonukleotide flankierten DNA-Sequenz kommt. Für die PCR wurden hitzestabile DNA-Polymerasen aus dem thermophilen *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) bzw. *Pyrococcus furiosus* (Pfu-Polymerase) eingesetzt, die ein Temperaturoptimum von über 70°C besitzen und für mehrere Minuten bei Temperaturen bis zu 95°C stabil sind.

Das Vorhandensein der TCR $\beta$ -Kettentransgene in genomischer DNA aus Mausbiopsaten TCR-transgener Mäuse wurde mit Hilfe der PCR mit P14 $\beta$ - (*P14jax*) bzw. OT-I $\beta$ -spezifischen Primern (*V $\beta$ 5*) untersucht (Tab. 13). Die P14jax-PCR wurde unter folgenden Konditionen durchgeführt: 3 min bei 94°C, 30 Zyklen von 40 s bei 94°C, 40 s bei 50°C, 40 s bei 72°C, gefolgt von einem letzten Elongationsschritt für 10 min bei 72°C. Die V $\beta$ 5-PCR wurde unter folgenden Konditionen durchgeführt: 3 min bei 94°C, 30 Zyklen von 40 s bei 94°C, 40 s bei 55°C, 40 s bei 72°C, gefolgt von einer Elongation für 10 min bei 72°C. Das Vorhandensein des Ova-Transgens in genomischer DNA aus Mausbiopsaten von RIP-Ova<sup>lo</sup> bzw. RIP-mOva Mäusen wurde mit Hilfe der PCR mit Ova-spezifischen Primern (*Ova*) untersucht. Die Ova-PCR wurde unter folgenden Konditionen durchgeführt: 5 min bei 95°C, 30 Zyklen von 30 s bei 95°C, 30 s bei 53°C, 30 s bei 72°C, gefolgt von einem letzten Elongationsschritt für 10 min bei 72°C. Die Anwesenheit der P14 $\beta$ - bzw. P14 $\beta$ -Transkripte in MP71-P14 $\beta$ - bzw. MP71-P14 $\beta$ -transfizierten GP+E86-Verpackungszellen wurde mit Hilfe der PCR mit P14 $\beta$ -spezifischen Primern (*V $\beta$ 2*) bzw. mit P14 $\beta$ -spezifischen Primern (*P14 $\beta$* -

*präparativ*) überprüft, bei der cDNA als Matrize diente. Die V<sub>2</sub>-PCR wurde unter folgenden Konditionen durchgeführt: 3 min bei 94°C, 30 Zyklen von 1,5 min bei 94°C, 1 min bei 50°C, 1 min bei 72°C, gefolgt von einem letzten Elongationsschritt für 10 min bei 72°C. Dem PCR-Reaktionsansatz wurden zusätzlich 75 nmol MgCl<sub>2</sub> sowie 2,5 µl DMSO zugefügt. Die P14-PCR wurde unter folgenden Konditionen durchgeführt: 3 min bei 94°C, 35 Zyklen von 1,5 min bei 94°C, 1 min bei 70°C, 1 min bei 72°C, gefolgt von einem letzten Elongationsschritt für 10 min bei 72°C.

**Tab. 13: Analytischer PCR-Reaktionsansatz:**

Genomische DNA bzw. cDNA	2,5 µl
dNTPs	40 nmol
Primer 1	20 pmol
Primer 2	20 pmol
10xPCR-Puffer	5 µl
Taq-Polymerase	2,5 U
<i>Aqua bidest.</i>	ad 50 µl

#### 4.2.5.5 Restriktionsverdau von DNA

Der DNA-Restriktionsverdau erfolgte mit Hilfe von Typ-II-Restriktionsendonukleasen (Tab. 14). Diese bakteriellen Enzyme erkennen vorwiegend kurze palindrome DNA-Abschnitte, innerhalb derer sie beide DNA-Stränge hydrolytisch spalten. Hierbei können stumpfe (*blunt ends*) oder, bei versetzter Spaltung, einzelsträngige kohäsive 3'-und 5'-Enden (*sticky ends*) entstehen. Der für einen DNA-Verdau verwendete Restriktionspuffer, die gewählte Inkubationstemperatur sowie die Enzymmenge variierten in Abhängigkeit von den verwendeten Enzymen, der DNA-Menge sowie des gewünschten Ergebnisses (vollständiger oder partieller Verdau).

**Tab. 14: Analytischer Restriktionsansatz (20 µl):**

DNA	5 µl (ca. 1 µg)
10 x Puffer	2 µl
Enzym	10-15 U
<i>Aqua bidest.</i>	ad 20 µl

#### 4.2.5.6 Agarose-Gelelektrophorese

PCR-Produkte bzw. nach Restriktionsverdau entstandene DNA-Fragmente wurden auf einem 1%-igen (Gewicht/Volumen) Agarosegel, dem 3 µl/100 ml Ethidiumbromid zugesetzt worden

war, in Horizontalgelapparaturen bei einer Spannung von 80 V aufgetrennt. Da Ethidiumbromid in die DNA interkaliert und unter UV-Licht (302 nm) orange-rote Fluoreszenz emittiert, können DNA-Banden im UV-Durchlicht sichtbar gemacht und zur Dokumentation mit einer Polaroid-Kamera photographiert werden. Die Fragmentgröße wurde anhand eines Größenstandards (1kb-DNA-Leiter) bestimmt. Um die Auftrennung der DNA verfolgen zu können und das Auftragen in die Geltaschen zu ermöglichen, wurde den Proben 1/10 Volumen OrangeG/Glyzerin zugesetzt.