

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Patientenmaterial

Alle für diese Arbeit verwendeten Tumoren waren nach der WHO Klassifikation als *low grade MALT lymphoma* (niedrig maligne Lymphome des Mukosa assoziierten lymphoiden Gewebes) klassifiziert worden. Weitere Eigenschaften sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Fallbezeichnung	Lokalisation	Immunphänotyp
13	Schilddrüse	IgM, Ig $\lambda$
18	Lunge	IgA, Ig $\lambda$
24	Speicheldrüse	IgM, Ig $\kappa$
1427	Magen	IgM, Ig $\kappa$
2573	Magen	IgM, Ig $\kappa$
4449	Magen	IgM, Ig $\kappa$
4476	Magen	IgM, Ig $\kappa$

#### 2.1.2 Vektoren

Vektorbezeichnung	Hersteller	Verwendung
pCRII-TOPO	Invitrogen	Klonierung von PCR Produkten
pIT2	Ian Tomlinson (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK)	enthält die scFv Strukturelemente
pMT BiP/V5-His C	Invitrogen	Drosophila Expressionsvektor

### 2.1.3 Zelllinien

Die für diese Arbeit verwendeten Zelllinien, ihre zelluläre Herkunft und ihr Verwendungszweck sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Zelllinie	Herkunft	Verwendung
Daudi	Humanes Burkitt-Lymphom (BL), B-Lymphozyten	Positivkontrolle für die IgH/Igκ Multiplex PCR,
Raji	Humanes Burkitt-Lymphom (BL), B-Lymphozyten	Positivkontrolle für die IgH/Igκ Multiplex PCR
U 266	Humane Myelomzellen, B-Lymphozyten	Positivkontrolle für die Igλ PCR
BerH2 Hybridom	Maus Hybridomzelllinie	Ausgangsmaterial zur Herstellung des BerH2-scFv
Karpas-299	Anaplastisch-Großzelliges-Lymphom (ALCL), T-Lymphozyten	Positivkontrolle für FACS Färbungen mit dem BerH2-scFv
DG75	Humane Burkitt-Lymphom (BL), B-Lymphozyten	Negativkontrolle für FACS Färbungen mit dem BerH2-scFv
Schneider 2 (S2) Zellen	Embryonale Drosophila melanogaster Zellen	Expression der scFv

### 2.1.4 PCR Primer

Die Sequenz und der Verwendungszweck der in dieser Arbeit verwendeten PCR Primer sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Name	Sequenz 5' - 3'	Verwendungszweck
VH1	CCTCAGTGAAGGT(CT)TCCTGCAAGGC	FR1FS Primermix für die Primär-amplifikation der Immunglobulin-Schwerkettengene
VH2	GTCCTGCGTGGTGAAA(GC)CCACACA	
VH3	GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG	
VH4	GACCCTGTCCCTCACCTGC(AG)CTGTC	
VH5	AAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGA(AG)GA	
VH6	ACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTG	
LJH	TGAGGAGACGGTGACC	Revers Primer für die Primäramplifikation der Immunglobulin-Schwerkettengene
FR2.1	TGGGTGCGACAGGCCCTGG	FR2FS Primermix für die Reamplifikation der Immunglobulin-Schwerkettengene
FR2.2	TGGATCCGTCAGCCCCCAGG	
FR2.3	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGG	
FR2.4	TGGRTCCGSCAGCCCCCAGG	
FR2.5	TGGGTGCGCCAGATGCCCGG	
FR2.6	TGGATCAGGCAGTCCCCATCG	
VLJH	GTGACCAGGTNCCTTGGCCCCAG	Revers Primer für die Reamplifikation der Immunglobulin-Schwerkettengene
VK1	ATCCRGWTGACCCAGTCTCCWTC	VK Primermix für die Primäramplifikation der Immunglobulin-κ-Leichtkettengene
VK2	AGWCTCACTCTCCCTGYCCGTC	

Name	Sequenz 5' - 3'	Verwendungszweck
VK3	TCCAGSCACCCTGTCTKTGTCTC	VK Primermix für die Primäramplifikation der Immunglobulin-κ-Leichtkettengene
VK4	TCCCTGGCTGTGTCTCTGGGC	
VK5	AGTCTCCAGCATTTCATGTCAGCGA	
VK6	TTYCTCTCTGTGACTCCARRGGAG	
3'JK1,2,4	ACTCACGTTTGATYTCCASCTTGGTCC	JK Primermix für die Primäramplifikation der Immunglobulin-κ-Leichtkettengene
3'JK3	GTACTIONACTTTGATATCCACTTTGGTCC	JK Primermix für die Primäramplifikation der Immunglobulin-κ-Leichtkettengene
3'JK5	GCTTACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCC	
VK1RN	AGGAGACAGAGTCCACATCA	VKRN Primermix für die Reamplifikation der Immunglobulin-κ-Leichtkettengene
VK2RN	AGCCGGCCTCCATCTCCTGCA	
VK3RN	TCTCCAGGGGAAAAGACCACC	
VK4RN	GCTGTGTCTCTGGGCGAGAG	VKRN Primermix für die Reamplifikation der Immunglobulin-κ-Leichtkettengene
VK5RN	TCAGCGACTCCAGGAGACAAAG	
VK6RN	GGAGAAAGTCACCATCACCTG	
5'JK1,2	TTGATYTCCASCTTGGTCCCCTGGC	
5'JK3	TGATATCCACTTTGGTCCCAGGGC	
5'JK4	TGATCTCCACCTTGGTCCCCTCCGA	
5'JK5	TAATCTCCAGTCGTGTCCCCTGGC	
DFDP47	GAGTCGACCATGGGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGG	Umlagerungsspezifischer VH Primer für die Fälle 1427, 4476
DFVH3	GAGTCGACCATGGGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGG	Umlagerungsspezifischer VH Primer für die Fälle 2573, 4449
DFDP71	TAGAGACCCATGGCAGGTGCAGCTGCAGTCG	Umlagerungsspezifischer VH Primer für den Fall 13
DFDP75/10	CAGTAGTCCATGGCAGGTGCAGCTGTTGCAGTC	Umlagerungsspezifischer VH Primer für den Fall 18, 24
DFJH3	CAGTAGACTCGAGGAAGAGACGGTGACCATTGTCCCTTG G	Umlagerungsspezifischer JH Primer für den Fall 4449
DFX2JH4b	GAGTCGACTCGAGGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC	Umlagerungsspezifischer JH Primer für die Fälle 1427, 2573, 4476
DFJH4d	GACAGCACTCGAGGAGGAGACGGTGACCAGGG	Umlagerungsspezifischer JH Primer für den Fall 18
DFJH6b	CAGTAGACTCGAGGAGACGGTGACCGTGGTC	Umlagerungsspezifischer JH Primer für den Fall 13
4449IH mu/up	GGTCACCGTCTCTTCCTCGAGCGGTGGAGGC	Forward Mutagenese Primer für den Fall 4449
4449IH mu/low	GCCTCCACCGCTCGAGGAAGAGACGGTGACC	Revers Mutagenese Primer für den Fall 4449
1427VL mu/up	GCGGGTCGACGAAAATTGTGTTGACGCAGTCTCC	Forward Mutagenese Primer für den Fall 1427
1427VL mu/low	GGAGACTGCGTCAACACAATTTCCGTCGACCCGC	Revers Mutagenese Primer für den Fall 1427
DFDPK20/22	AGCTGAGGTGCACGAAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAG	Umlagerungsspezifischer VK Primer für die Fälle 24, 1427
DFDPK21	AGCTGAGGTGCACGAAAATAGTGATGACGCAGTCTCC	Umlagerungsspezifischer VK Primer für den Fall 4449
DFSVK4	CTCAGCTGTGACGACATCGTGATGACCCAGTCTC	Umlagerungsspezifischer VK Primer für den Fall 2573
DFS2DPK8	AGCTGAGGTGCACGACATCCAGTTGACCCAGTCTCC	Umlagerungsspezifischer VK Primer für den Fall 4476
DFJK1.2	GAGTCGAGCGGCCGCTTTGATTTCCACCTTGGTCCCCTG	Umlagerungsspezifischer JK Primer für die Fälle 1427, 2573, 4449, 24
DFJK4.2	GAGTCGAGCGGCCGCTTTGATCTCCACCTTGGTCCC	Umlagerungsspezifischer JK Primer für den Fall 4476
BVH 150F	GTGATACCTACTATCCTTCTGTCC	Forward Primer für die Primäramplifikation der IgH Sequenz des BerH2 Hybridoms
BVH 560R	ACCTGCAGAGACAATGACC	Revers Primer für die Primäramplifikation der IgH Sequenz des BerH2 Hybridoms
BVH/pMT	GACTCGACCATGGCAGGTCCAGCTTACAGAG	Forward Primer für die Reamplifikation der IgH Sequenz des BerH2 Hybridoms zur Klonierung in den Vektor pMTBiP/V5-HisB
BVHb 189F	GAGTCGAGGCCAGCCGGCCATGGCCAGGTCCAGCTTC AGCAG	Forward Primer für die Reamplifikation der IgH Sequenz des BerH2 Hybridoms zur Klonierung in den Vektor pIT2

Name	Sequenz 5' - 3'	Verwendungszweck
BVH557R	GACTCGACTCGAGGCAGAGACAGTGACCAG	Revers Primer für die Reamplifikation der IgH Sequenz des BerH2 Hybridoms zur Klonierung in die Vektoren pMTBiP/V5-HisB und pIT2
BVL 377F	TGCTGATGGGAACATTGTAA	Forward Primer für die Primäramplifikation der Igκ Sequenz des BerH2 Hybridoms
BVL 710R	ACGTTTTATTTCCAGCTTGG	Revers Primer für die Primäramplifikation der Igκ Sequenz des BerH2 Hybridoms
BVL387F	GACTCGAGTCGACGAACATTGTAATGACCCAATCT	Forward Primer für die Reamplifikation der Igκ Sequenz des BerH2 Hybridoms
LMB3	CAGGAAACAGCTATGAC	Primer für den Vektor pIT2
Link Fwd	CAGCGGCGGTGGCGGGTCG	
Link Rev	CGACCCGCCACCGCCGCTG	
pHEN	CTATGCGGCCCATTTCA	
M13 Fwd (-20)	GTAAAACGACGGCCAG	Primer für den Vektor pCRII-TOPO
M13 Rev	CAGGAAACAGCTATGAC	
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
MT Fwd	CATCTCAGTCAACTAAA	Primer für den Vektor pMTBiP/V5-HisB
pcDNA3.1	TAGAAGGCACAGTCGAGG	
BVL707R	GACTCGAGCGCCGCTTTTATTTCCAGCTTGGT	Revers Primer für die Reamplifikation der Igκ Sequenz des BerH2 Hybridoms

## 2.1.5 Lösungen

### LB Medium (5 x):

125 g Luria Broth Base (Gibco BRL)  
mit aqua dest. auf 1 l auffüllen, autoklavieren;

### LB Agar:

185 g Luria Agar (Gibco BRL)  
mit aqua dest. auf 1 l auffüllen, autoklavieren;

Zum Gießen der Platten auf ca. 40°C abkühlen lassen und Antibiotikum zugeben (z.B. Ampicillin 100µg/ml)

### Lysis-Puffer für *Helicobacter pylori*:

50 mM Tris-Puffer, pH 7,8  
150 mM NaCl (Roth)  
1% Nonidet P40 (LKB Produkte)  
1 x Complete Protease Inhibitor (Roche)

### DNA Probenpuffer:

100 µl 0,25 x Xylene Cyanol FF  
500 µl 10 x Orange G  
900 µl H<sub>2</sub>O

---

<b>Formamidmix zur Sequenzierung:</b>	5 Teile deionisiertes Formamid 1 Teil 25 mM EDTA (pH 8,0) mit Dextran Blau (50 mg/ml)
<b>TBE (20 x):</b>	1,8 M Tris (hydroxymethyl)aminomethan (Roth) 1,8 M Borsäure (Roth) 0,05 M Na <sub>2</sub> EDTA (Gibco BRL)
<b>TAE (50 x):</b>	2 M Tris (hydroxymethyl)aminomethan (Roth) 0,05 M EDTA, pH 8,0 5,7% Eisessig (J.T.Baker)
<b>Acrylamidlösung (6%) für DNA Gele:</b> (ausreichend für ca. 15 Minigele)	5 ml 20 x TBE 15 ml 40% Acrylamid/Bisacrylamid (19:1, Gibco BRL) 80 ml H <sub>2</sub> O 0,5 ml 10% Ammoniumpersulfat (APS, Bio-Rad) 40 µl TEMED (Bio-Rad)

Alle Substanzen wurden miteinander gemischt und zügig verwendet, da das Acrylamid zu polymerisieren beginnt, sobald APS und TEMED zugegeben wird. Das APS wurde entweder frisch angesetzt und sofort verbraucht oder bei -20°C gelagert.

### **Lösungen für die Protein Gelelektrophorese:**

<b>Elektrodenpuffer (10 x):</b>	0,25 M Tris (hydroxymethyl)aminomethan (Sigma) 1,92 M Glycin (Roth) 1% Sodiumdodecylsulfat (SDS, Merck) pH 8,3
---------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**Sammelgelpuffer (4 x):** 0,5 M Tris-Puffer, pH 6,8

**Trenngelpuffer (4 x):** 1,5 M Tris-Puffer, pH 8,8

**Acrylamidlösungen (ausreichend für ca. 5 Minigele):**

**12% Trenngel:** 10 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1,  
Bio-Rad)  
6,2 ml 4 x Trenngelpuffer  
8,5 ml Millipore H<sub>2</sub>O  
250 µl 10% Sodiumdodecylsulfat (SDS,  
Merck)  
125 µl 10% Ammonium Persulfat (in H<sub>2</sub>O,  
Bio-Rad)  
12,7 µl TEMED (Bio-Rad)

**4% Sammelgel:** 1,6 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1,  
Bio-Rad)  
3,0 ml 4 x Sammelgelpuffer  
7,2 ml Millipore H<sub>2</sub>O  
120 µl 10% Sodiumdodecylsulfat (SDS,  
Merck)  
60 µl 10% Ammonium Persulfat (in H<sub>2</sub>O,  
Bio-Rad)  
12 µl TEMED (Bio-Rad)

**Lösungen für die Silberfärbung:**

**Natriumthiosulfatlösung:** 83 µl 10% Natriumthiosulfat (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x  
5 H<sub>2</sub>O, Merck)  
50 ml Millipore H<sub>2</sub>O

Die 10% ige Natriumthiosulfatlösung wird mit Millipore H<sub>2</sub>O angesetzt und ist ca. 4 Monate bei RT haltbar.

**Imprägnierungslösung:** 0,7 ml 20% Silbernitrat ( $\text{AgNO}_3$ , Merck)  
0,5 ml 37% Formaldehyd ( $\text{HCHO}$ , J.T. Baker)  
48,8 ml Millipore  $\text{H}_2\text{O}$

Die 20% ige Silbernitratlösung wird mit Millipore  $\text{H}_2\text{O}$  angesetzt und ist im Dunkeln ca. 4 Monate bei RT haltbar.

**Entwicklerlösung:** 1 g Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Merck)  
21  $\mu\text{l}$  37% Formaldehyd ( $\text{HCHO}$ , J.T. Baker)  
25  $\mu\text{l}$  10% Natriumthiosulfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , (Merck)  
50 ml Millipore  $\text{H}_2\text{O}$

### Lösungen für Immunoblots und ProteinfILTER:

**Transferpuffer:** 0,025 M Tris (hydroxymethyl)aminomethan  
(Sigma)  
0,192 M Glycin (Roth)  
20% Methanol  
pH 8,3

**Blockierungspuffer:** PBS Dulbecco`s w/o Ca, Mg (Gibco BRL)  
0,1% Tween 20 (Serva)  
5% Magermilchpulver (Töpfer GmbH)

**PBS-T:** PBS Dulbecco`s w/o Ca, Mg (Gibco BRL)  
0,1% Tween 20 (Serva) für Immunoblots,  
und Proteinlösungen  
0,05% Tween 20 für ELISA

### Lösungen für die Immunhistologie:

**Tris-Puffer:** 50 mM Tris, pH 7,4 - 7,6  
150 mM NaCl (Roth)

Für die Färbung von Paraffinschnitten wird dem Puffer 0,1% Tween 20 zugegeben.

**Citrat-Puffer:** 0,1 M Citronensäure Monohydrat (Merck)

**Glucoseoxidase-Puffer:** PBS Dulbecco`s w/o Ca, Mg (Gibco BRL)  
20 mM  $\beta$ -D Glucose (Roth)  
2 mM Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ , Merck)  
0,005 g (800 U) Glucoseoxidase (Sigma)

**Hämalaunlösung:** 50 g Kalialaun (Merck)  
1 g Hämatoxylin (Merck)  
0,2 g  $\text{NaJO}_3$  (Merck)

Die Substanzen werden in 1 l aqua dest. unter Rühren ü.N. gelöst. Danach werden  
50 g Chloralhydrat (Merck)  
1 g Zitronensäure (Merck)

zugegeben und die Lösung erneut über Nacht gerührt.

### Lösungen für die FPLC:

**Startpuffer:** 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}/\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
(Merck)  
500 mM NaCl (Roth)  
pH 8,0

Der Puffer wird mit Millipore  $\text{H}_2\text{O}$  angesetzt, filtriert (0,22  $\mu\text{m}$  Millipore Filter) und entgast.

**Elutionspuffer:** 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}/\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
(Merck)  
500 mM NaCl (Roth)  
500 mM Imidazol (Merck)  
pH 8,0

Der Puffer wird mit Millipore  $\text{H}_2\text{O}$  angesetzt, filtriert (0,22  $\mu\text{m}$  Millipore Filter) und entgast.

**Lösungen für die Peptidarrays:****Aminosäurelösungen zur Kopplung:**

Alle Aminosäurelösungen wurden 0,3 M angesetzt.  $\beta$ -Alanin (Fmoc- $\beta$ -Alanin-Opfp, Bachem) wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck) gelöst, alle anderen Aminosäuren in 1-Methyl-2-Pyrrolidon (NMP, Fluka). Arginin und  $\beta$ -Alanin wurden immer frisch angesetzt, alle anderen Lösungen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und bei Bedarf aufgetaut.

Verwendet wurden L-Aminosäuren der Firmen Perseptive Biosystems, Bachem und Novabiochem. Die Seiten- und Aminogruppen der Aminosäuren waren chemisch blockiert um Reaktionen während der Kopplung zu vermeiden.

**90% Trifluoressigsäure:**

90% Trifluoressigsäure  
3% Triisopropylsilan (TIPS)  
2%  $\text{H}_2\text{O}$   
5% Dichlormethan (DCM)  
1 g Phenol

**50% Trifluoressigsäure:**

50% Trifluoressigsäure  
3% Triisopropylsilan (TIPS)  
2%  $\text{H}_2\text{O}$   
45% Dichlormethan (DCM)  
1 g Phenol

**TBS (10 x):**

1,37 M NaCl (Merck)  
27 mM KCl (Merck)  
0,5 M Tris (hydroxymethyl)aminomethan  
(Sigma)

Der pH Wert wird mit HCl auf 8,0 eingestellt und die Lösung mit Millipore  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 l aufgefüllt.

**TBS-T:**

TBS, pH 8,0  
0,05% Tween 20 (Merck)

**Blockierungspuffer:**

5 ml Blocking Buffer (Genosys  
Biotechnologies)  
5 ml 10 x TBS, pH 8,0  
250  $\mu$ l 10% Tween 20 (Merck)  
auf 50 ml mit Millipore H<sub>2</sub>O auffüllen

**Regenerierungspuffer:**

6 M Harnstoff (Merck)  
2 M Thioharnstoff (Merck)  
35 mM Sodiumdodecylsulfat (SDS, Fluka)  
auf 1 l mit Millipore H<sub>2</sub>O auffüllen

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Isolierung und Quantifizierung von Nukleinsäuren**

#### **2.2.1.1 Isolierung von genomischer DNA**

Genomische DNA aus Zelllinien und Gefrierschnitten wurde mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) entsprechend den Protokollen des Herstellers für kultivierte Zellen oder Gewebe isoliert. Als Ausgangsmaterial dienten jeweils ca.  $1 - 5 \times 10^6$  Zellen bzw. 3 - 5 Gewebeschnitte à 30 µm. Der Proteinase K Verdau wurde 1 h (Zelllinien) bzw. über Nacht (Gefrierschnitte) durchgeführt. Vor der Elution wurde die DNA auf den Säulen in 100 µl (Zelllinien) bzw. 50 µl 70°C warmem Elutionspuffer inkubiert.

#### **2.2.1.2 Isolierung von Plasmid DNA**

Zur Isolierung kleinerer Plasmid Mengen wurde aus 1,5 ml einer LB – Ampicillin (LB-Amp) Übernachtskultur die DNA nach Protokoll des Herstellers isoliert (Quantum Prep Plasmid Mini Kit, Bio-Rad). Zur Analyse wurden 10 µl der Plasmidpräparation auf einem Agarosegel (1%) aufgetrennt.

Zur Extraktion größerer Plasmid Mengen wurde der Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen) zusammen mit QIAfilter Maxi Cartridges (Qiagen) verwendet. Eine Vorkultur (5 ml) wurde in 500 ml frisches LB-Amp Medium überführt und über Nacht im Schüttler bei 37°C inkubiert. Zur Plasmidisolierung wurde diese Kultur in zwei Aliquots aufgeteilt und entsprechend den Anweisungen des Herstellers weiter behandelt. Zum Schluß wurde die DNA in 300 µl 10 mM Tris-Cl, pH 8,5 aufgenommen.

#### **2.2.1.3 Isolierung von RNA**

Gesamt RNA wurde aus Gefrierschnitten mit Hilfe des RNeasy Kits (Qiagen) nach den Anweisungen des Herstellers gewonnen. Pro Fall wurden 15 - 20 Schnitte von 30 µm Dicke

eingesetzt. Für die Homogenisierung des Gewebes im Lysispuffer wurden QIAshredder (Qiagen) eingesetzt. Um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden, wurden während der Versuchsdurchführung Handschuhe getragen, der Arbeitsplatz und alle verwendeten Geräte mit RNase Zap (Ambion) dekontaminiert und nur RNase freie Gefäße verwendet.

#### **2.2.1.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch anhand der Absorption bei 260 nm bestimmt. 1 OD<sub>260nm</sub> entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm.

Um die Reinheit der Nukleinsäurepräparationen abzuschätzen wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen. Der Quotient OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> gibt Aufschluss über die Verunreinigung mit Proteinen und sollte > 1,6 sein.

#### **2.2.2 Isolierung von Tumorzellverbänden aus Gefrierschnitten (Mikrodissektion)**

Um sicher zu stellen, dass die aus der Amplifikation der genomischen DNA erhaltene klonale Umlagerung von den Tumorzellen stammt, wurden aus immunhistologisch gefärbten Gefrierschnitten Tumorzellverbände isoliert und die Immunglobulinen-Umlagerungen mit Hilfe der unter 2.2.3.1 beschriebenen PCR amplifiziert.

Unter einem Mikroskop wurden hierfür die Tumorzellen anhand der Färbung und Morphologie identifiziert und mit Hilfe einer in eine Mikromanipulationsanlage eingespannten Pipette aus dem Gewebe herausgelöst. Dieser Vorgang wurde fotografisch durch Vorher/Nachher Aufnahmen dokumentiert. Die isolierten Zellen wurden in ein PCR Gefäß mit 10 µl 1 x TaqGold Puffer (Applied Biosystems) und Proteinase K (0,1 mg/ml, Qiagen) überführt und dann 1 - 2 h bei 50°C inkubiert, um die DNA freizusetzen. Nach der Inaktivierung der Proteinase K (96°C, 10 min) wurden die Proben entweder eingefroren oder sofort in die PCR eingesetzt. Um die Spezifität der PCR zu kontrollieren, wurden zwischen den Isolierungen der Zellen Proben des Überschichtungspuffers genommen und als Negativkontrolle ebenfalls in die PCR eingesetzt.

## **2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)[27]**

### **2.2.3.1 Multiplex PCR zur Identifizierung der tumorspezifischen Immunglobulingenumlagerungen[28;29]**

Mit Hilfe dieser PCR wurde zunächst überprüft, welche Fälle dominante Umlagerungen der Immunglobulinleicht- und -schwerkettengene aufwiesen. Nur Fälle mit klonalen Umlagerungen wurden für die weiteren Experimente verwendet. Durch die Sequenzierung der PCR Produkte konnten außerdem die entsprechenden umgelagerten V- und J-Segmente identifiziert werden. Um Kontaminationen zu erkennen, wurden Negativkontrollen mitgeführt, also PCR Ansätze ohne DNA, in denen kein PCR Produkt entstehen durfte. Zur Kontrolle der Spezifität und Sensitivität der PCR wurden die entsprechenden Immunglobulingenumlagerungen außerdem aus einer Verdünnungsreihe (100 ng – 10 pg) von Zelllinien DNA (Daudi, Raji, U266) und aus Tonsillen DNA (100 ng) amplifiziert. Die Zelllinien DNA sollte ein klonales, die Tonsillen DNA ein polyklonales Bandenmuster ergeben. Die Menge der eingesetzten DNA der Tumorfälle betrug 100 - 400 ng genomische DNA oder 0,5 µl cDNA.

#### **2.2.3.1.1 Immunglobulinschwerketten (IgH) PCR**

Zur Amplifikation der umgelagerten IgH Gene wurde eine PCR mit einem äquimolaren Mix aus familienspezifischen VH-Segment Primern und Konsensus J-Region Primern (LJH/VLJH) durchgeführt. Die VH Primer der Primäramplifikation (FR1FS) binden im Framework 1 Bereich des VH Segmentes, die VH Primer der Sekundäramplifikation (FR2FS) sind Framework 2 spezifisch (*nested* PCR).

Die PCR wurde in einem Volumen von 100 µl mit 2,5 U TaqGold Polymerase (Applied Biosystems) und TaqGold Puffer durchgeführt. In beiden Amplifikationsrunden betrug die Konzentration an Magnesiumchlorid 1,5 mM, die jedes dNTPs (Amersham Bioscience) 0,2 mM. Von dem FR1FS Primermix wurden 300 ng eingesetzt, zusammen mit 75 ng LJH Primer. Von dem FR2FS Mix wurden 200 ng verwendet, zusammen mit 200 ng VLJH Primer. Die Amplifikationsbedingungen für die Primäramplifikation waren 95°C 10 min, 5 x (95°C 25 sec, 63°C 30 sec, 72°C 30 sec; ramp 45 sec), 35 x (95°C 25 sec, 57°C 30 sec, 72°C

30 sec; ramp 45 sec), 72°C 7 min. Die Bedingungen für die Reamplifikation waren 95°C 10 min, 25 x (95°C 25 sec, 63°C 30 sec, 72°C 30 sec; ramp 45 sec), 72°C 7 min. Beide PCRs wurden in einem TC 9600 Cycler durchgeführt (Applied Biosystems). Zur Analyse wurden 6 µl des PCR Ansatzes auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die erwartete Produktgröße nach der Reamplifikation betrug ca. 250 – 320 bp.

#### ***2.2.3.1.2 Immunglobulin-Kappa (Igκ) PCR***

Für die Amplifikation der Umlagerung der κ-Leichtkettengene wurde ein Mix aus sechs familienspezifischen Vκ Primern verwendet (Vκ1,6; Vκ2; Vκ3; Vκ4; Vκ5; Vκ7) und ein Mix aus zwei familienspezifischen Jκ Primern (Jκ1 - 4; Jκ5). Die PCR wurde in einem Volumen von 50 µl mit 1,25 U TaqGold Polymerase (Applied Biosystems) und TaqGold Puffer durchgeführt. Die Konzentration an MgCl<sub>2</sub> betrug 1,5 mM, die jedes dNTPs (Amersham Bioscience) 0,2 mM und von jedem Primer wurden 10 pmol eingesetzt. Die Amplifikationsbedingungen in einem TC 9600 Cycler (Applied Biosystems) waren 95°C 10 min, 40 x (95°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 45 sec), 72°C 10 min. Zur Analyse wurden 6 µl des PCR Ansatzes auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die erwartete Produktgröße betrug ca. 300 bp.

#### ***2.2.3.1.3 Immunglobulin-Lambda (Igλ) PCR***

Für die Amplifikation der Umlagerung der λ-Leichtkettengene wurden zwei familienspezifische Vλ-Primer (Vλ1,2; Vλ3) und ein Konsensus Jλ-Primer (Jλ1 - 3) verwendet. In diesem Fall wurden die Vλ-Primer nicht als Mix, sondern jeweils in getrennten 50 µl PCR Ansätzen mit dem Jλ-Primer eingesetzt. Die Menge jedes Primers betrug 10 pmol, die Konzentration an MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM und die jedes dNTPs 0,3 mM. Pro Ansatz wurden 2 U TaqGold Polymerase (Applied Biosystems) und Puffer II verwendet. Die Amplifikationsbedingungen waren 95°C 10 min, 40 x (95°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 45 sec), 72°C 10 min in einem PTC-200 Cycler (MJ Research). Zur Analyse wurden 6 µl des PCR Ansatzes auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die erwartete Produktgröße betrug ca. 150 bp.

## 2.2.3.2 PCR zur Amplifikation bekannter Immunglobulingenumlagerungen

### 2.2.3.2.1 Amplifikation der Immunglobulingenumlagerung des *BerH2* Hybridoms

Für das Schwer- und das Leichtkettengen wurden jeweils zwei geschachtelte (*nested*) Primerpaare hergestellt. Die äußeren Primerpaare (BVH 150F, BVH 560R, BVL 377F, BVL 710R) lagen außerhalb des kodierenden Bereichs, die inneren Paare (BVHb pMT, BVH 557R, BVL 377F, BVL 710R) direkt an den 5'- Enden der V-Segmente, bzw. den 3'- Enden der J-Segmente. Um eine Klonierung zu ermöglichen, enthielten diese inneren Primer Restriktionsenzymststellen (*Nco I/Xho I* (VH) und *Sal I/Not I* (Vκ)), gefolgt von weiteren 7 beliebigen Nukleotiden, die eine direkte Restriktion des PCR Produktes ermöglichen. Alle Amplifikationen wurden in einem TC 9600 Cycloer (Applied Biosystems) in einem Volumen von 100 µl mit 2 U AmpliTaq (Applied Biosystems) und Puffer II durchgeführt. Von jedem Primer wurden 20 pmol eingesetzt, von jedem dNTP (Amersham Bioscience) 0,2 mM. Die Konzentration an MgCl<sub>2</sub> betrug 1,5 mM, außer bei der primären VH Amplifikation (1 mM). Als Ausgangsmaterial dienten 10 ng genomische DNA und in der Reamplifikation wurde 1 µl der Primäramplifikation verwendet. Die Bedingungen für die Primäramplifikation waren 96°C 2 min, 35 x (96°C 15 sec, 60°C 30 sec, 72°C 30 sec), 72°C 7 min, die für die Reamplifikation 96°C 2 min, 5 x (96°C 15 sec, 55°C 30 sec, 72°C 30 sec), 30 x (96°C 15 sec, 72°C 1 min), 72°C 7 min. Zur Analyse wurden 6 µl des PCR Ansatzes auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Produktgrößen der Primäramplifikationen betragen 411 bp (VH) und 334 bp (Vκ), die Produktgrößen der Reamplifikation 395 bp (VH) und 350 bp (Vκ).

### 2.2.3.2.2 Amplifikation der Immunglobulingenumlagerungen der *MALT-Lymphome*

Wenn die für die Umlagerung der Immunglobulingene verwendeten Keimbahnsegmente einer Tumorzellpopulation identifiziert waren, wurde diese Information für die Synthese von spezifischen Primern zur Amplifikation der vollständigen Gene benutzt. Diese Primer entsprachen dem 5'- Ende der jeweiligen V-Segmente, bzw. dem 3'- Ende der jeweiligen

J-Segmente. Zusätzlich enthielt jeder Primer eine Restriktionsenzymstichstelle und weitere Nukleotide, wie unter 2.2.3.2.1 beschrieben.

In den meisten Fällen wurde die Amplifikation mit PfuTurbo DNA Polymerase (Stratagene) durchgeführt. Durch seine 3' - 5' Exonuklease Aktivität ist dieses Enzym in der Lage falsch synthetisierte Basen im PCR Produkt zu entfernen und gewährleistet so ein genaues Ablesen der DNA. Als Ausgangsmaterial für einen PCR Ansatz von 100 µl dienten 200 - 400 ng genomische DNA oder 0,5 µl cDNA. Von der Pfu Polymerase wurden 2,5 U und von jedem Primer 20 pmol eingesetzt. Die Konzentration an MgSO<sub>4</sub> betrug 2 mM (im Puffer vorhanden), die jedes dNTPs (Amersham Bioscience) 0,2 mM. Die Bedingungen für die Amplifikation waren 96°C 2 min, 5 x (96°C 30 sec, 62°C 30 sec, 72°C 30 sec), 35 x (96°C 30 sec, 72°C 1 min), 72°C 10 min in einem PTC-200 Cycler (MJ Research). Zur Analyse wurden 6 µl des PCR Ansatzes auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die erwartete Produktgröße betrug ca. 380 bp.

In den Fällen, in denen es nicht möglich war mit der Pfu Polymerase ein PCR Produkt zu erhalten, wurden 1,25 U TaqGold Polymerase (Applied Biosystems) zusammen mit TaqGold Puffer eingesetzt. Die Konzentration an MgCl<sub>2</sub> betrug 1,5 mM, die übrigen Reaktionsbedingungen entsprachen denen unter 2.2.3.1.1. Die Amplifikationsbedingungen waren 95°C 10 min, 5 x (95°C 25 sec, 62°C 30 sec, 72°C 30 sec), 35 x (95°C 25 sec, 72°C 1 min), 72°C 10 min in einem PTC-200 Cycler (MJ Research).

### **2.2.3.3 Kolonie PCR**

Die Kolonie PCR wurde zur Analyse klonierter DNA Fragmente eingesetzt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde ein Teil einer Bakterienkolonie aufgenommen und mehrmals kurz in einen fertigen PCR Ansatz eingetaucht. Für eine anschließende Miniprep des jeweiligen Klons wurde die Spitze danach in 5 ml LB-Ampicillin Medium überführt und wie unter 2.2.14 beschrieben kultiviert. Um die Transformationseffizienz zu analysieren, war ein PCR Ansatz von 20 µl ausreichend. Sollte das klonierte Fragment sequenziert werden, wurde ein Volumen von 100 µl verwendet. Die Amplifikation kann mit vektorspezifischen Primern aber auch mit PCR Produkt-spezifischen Primern erfolgen. Von jedem Primer wurden pro PCR Ansatz 10 pmol eingesetzt, die Magnesiumchloridkonzentration betrug 1,5 mM und die Konzentration jedes dNTPs (Amersham Bioscience) 0,2 mM. Von der TaqGold Polymerase (Applied Biosystems) wurden 0,02 U/µl zugegeben. Die Cycler Bedingungen (PTC-200, MJ

Research) waren 95°C 10 min, 34 x (95°C 25 sec, 55°C 1 min, 72°C 1 min), 72°C 10 min. Als Positivkontrolle wurden 10 ng eines entsprechenden fragmenthaltigen Vektors eingesetzt. Nach Beendigung der PCR wurden 6 µl des Ansatzes auf einem Agarosegel aufgetrennt. War ein PCR Produkt der richtigen Größe vorhanden, wurde es entweder aus dem restlichen PCR Ansatz aufgereinigt und sequenziert oder das gesamte Plasmid wurde aus der entsprechenden LB-Ampicillin Kultur durch eine Miniprep isoliert.

#### **2.2.4 *In-Vitro* Mutagenese**

Die *In-Vitro* Mutagenese (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene) wurde angewandt, um Abweichungen der DNA Sequenz von PCR Produkten im Vergleich zur Ausgangs-DNA zu beseitigen.

Als Ausgangsmaterial dient doppelsträngige Plasmid DNA, die das zu verändernde Fragment enthält. Für jede Strangrichtung werden Oligonukleotide mit der gewünschten Veränderung synthetisiert und mit Hilfe der PCR verlängert, so dass mutierte Plasmide mit Einzelstrangbrüchen entstehen. Im Anschluss wird durch die Zugabe des Restriktionsenzym *Dpn I*, die aus den Bakterien stammende, methylierte Ausgangs-DNA abgebaut und nur die mutierte DNA bleibt erhalten. Nach Transformation in XL1-Blue-*E. coli* Zellen werden die Einzelstrangbrüche repariert und die DNA kann wie gewohnt in gewünschter Menge isoliert werden.

Die Plasmid DNA wurde in Mengen von 5, 10, 20 und 50 ng in die PCR (50 µl) eingesetzt, von den Primern wurden jeweils 125 ng verwendet, von der PfuTurbo Polymerase 2,5 U. Die Konzentration jedes dNTPs betrug 0,4 mM. Die Amplifikationsbedingungen im PTC-200 Cycler (MJ Research) waren 95°C 30 sec, 12 x (95°C 30 sec, 55°C 1 min, 68°C 10 min). Die Zahl der Zyklen richtete sich nach der Art der gewünschten Mutation und betrug 12 für Punktmutationen. Für den Verlängerungsschritt wurden 2 min pro 1000 bp DNA veranschlagt. Die mutierte DNA wurde dann für 2 h bei 37°C mit 10 U *Dpn I* inkubiert und anschließend 1 µl dieses Ansatzes durch einen Hitzeschock (45 sec, 42°C) in XL1-Blue Zellen transformiert. In 500 µl 42°C warmem SOC Medium wurden die Zellen dann für 1 h bei 37°C bei 225 rpm geschüttelt und jeweils 50 µl und 200 µl auf LB-Ampicillin Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert und der Erfolg der Mutagenese durch Isolierung der Plasmid DNA und anschließende Sequenzierung überprüft.

### 2.2.5 Sequenzierung[30]

Für die Sequenzierung von DNA wurde der ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) verwendet.

Zur direkten Sequenzierung von PCR Produkten wurden die jeweiligen Reamplifikationsprimer (50 ng/μl) verwendet, zur Analyse klonierter DNA Fragmente wurden entsprechende Vektorprimer (200 ng/μl) eingesetzt. Als Ausgangsmaterial dienten 10 – 50 ng PCR Produkt bzw. 400 ng Plasmid DNA. Zu DNA und Primern wurden 8 μl Big Dye Terminator Mix gegeben und der Ansatz auf 20 μl mit aqua dest. aufgefüllt. Die anschließende PCR wurde in einem TC 9600 Cycler (Applied Biosystems) bei 95°C 2 min, 25 x (96°C 15 sec, 45°C 15 sec, 60°C 4 min, ramp 45 sec) durchgeführt. Zur Abtrennung der entstandenen PCR Produkte von den überschüssigen fluoreszenzmarkierten ddNTPs und anderen störenden Molekülen, wurde der PCR Ansatz über Sephadex G50 Superfine Säulen (Amersham Bioscience) aufgereinigt, die DNA getrocknet, in 6 μl Formamidmix aufgenommen und im Dunkeln unter Schütteln resuspendiert. Nach einem Denaturierungsschritt (95°C, 2 min) wurden 2 μl der Probe auf ein 4,5% iges denaturierendes Sequenzgel aufgetragen und in einem ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) mit der zugehörigen Software analysiert.

### 2.2.6 Sequenzauswertung

Die Sequenz eines DNA Fragmentes wurde durch den Abgleich der Sequenzen der beiden komplementären Stränge ermittelt (Sequence Navigator Vers 1.0, Applied Biosystems).

Zur Identifizierung von Immunglobulingenumlagerungen und eingefügten somatischen Mutationen wurden die Sequenzen mit den Datenbanken VBase (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc>) und IMGT (<http://imgt.cnusc.fr:8104>) verglichen. Um PCR Kontaminationen auszuschließen wurden außerdem alle Sequenzen mit einer laborinternen Datenbank abgeglichen.

### **2.2.7 GeneScan Analyse**

Die GeneScan Analyse wurde zur Darstellung der Klonalität der MALT Lymphom Fälle verwendet.

Dazu wurde die PCR wie unter 2.2.3.1 beschrieben durchgeführt, aber bei der Reamplifikation ein fluoreszenzmarkierter (FAM) reverser Primer verwendet und der letzte Elongationsschritt auf 45 Minuten ausgedehnt. Die fluoreszierenden PCR Produkte wurden in einer geeigneten Verdünnung auf einem Sequenzgel aufgetrennt und in einem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) unter Verwendung der GeneScan Software 672 (Applied Biosystems) analysiert.

### **2.2.8 Isolierung von PCR Fragmenten und Produkten aus Restriktionsanalysen**

Wenn in der PCR nur ein Amplifikat entstanden war, wurde dieses direkt aus dem PCR Ansatz aufgereinigt (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen).

Waren mehrere Produkte entstanden oder sollten Produkte aus Restriktionsanalysen isoliert werden, wurde der Reaktionsansatz zunächst elektrophoretisch aufgetrennt. Dann wurde das Gelstück mit dem Produkt der gewünschten Größe unter UV Licht mit einem Skalpell aus dem mit Ethidiumbromid gefärbten Gel ausgeschnitten. Dabei war darauf zu achten, dass die DNA dem UV Licht nicht zu lange ausgesetzt wird, da sonst Strangbrüche entstehen können. Die Extraktion der DNA aus Agarosegelstücken erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) gemäß der Anleitung des Herstellers. Polyacrylamidgelstücke wurden in ein Eppendorfgefäß mit 20 - 30 µl H<sub>2</sub>O überführt und die DNA wurde ü. N. bei Raumtemperatur oder 2 h bei 50°C durch Diffusion eluiert.

### **2.2.9 Restriktionsanalyse**

Restriktionsenzyme erkennen spezifische DNA Sequenzen und spalten an diesen Stellen den Doppelstrang. Plasmide und DNA Fragmente, die Erkennungssequenzen für das gleiche Enzym enthalten, können durch eine Restriktionsspaltung über die entstandenen Enden miteinander verbunden bzw. auch wieder getrennt werden. Die Reaktion wurde meistens in

einem Volumen von 20 µl ausgeführt und pro µg DNA wurde ca. 1 U Enzym zugegeben. Der verwendete Puffer und die Reaktionstemperatur richtete sich nach den Angaben des Enzymherstellers. Wurde die DNA anschließend für Klonierungen verwendet, fand die Inkubation über Nacht statt, um eine möglichst vollständige Spaltung zu gewährleisten. Anschließend wurden die Produkte aus einem Agarosegel isoliert und in H<sub>2</sub>O aufgenommen. Für eine qualitative Analyse war eine einstündige Inkubation ausreichend.

## **2.2.10 Gelelektrophorese zur Auftrennung von Makromolekülen**

### **2.2.10.1 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde für die Analyse von DNA im Größenbereich von 400 bp bis ca. 5 kb verwendet. Entsprechend der Größe der aufzutrennenden Moleküle variierte die Agarosekonzentration zwischen 0,7 - 1,5%.

Die Agarose wurde in 1 x TAE Puffer durch Kochen gelöst, auf ca. 60°C abgekühlt, mit Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelschlitten von gewünschter Größe gegossen. Anschließend wurde ein geeigneter Kamm zur Erzeugung der Probenaschen eingesetzt. Nach dem Erstarren der Agarose wurde der Kamm entfernt und das Gel mit dem Schlitten in eine mit 1 x TAE Puffer gefüllte, horizontale Gelkammer gelegt. Die mit Ladepuffer versetzten Proben und ein DNA Größenstandard (600 ng der 1 kb DNA Leiter, GIBCO BRL) wurden in die Taschen pipettiert und bei Spannungen zwischen 80 - 120 Volt aufgetrennt (Power Supply ST 606 T, Gibco BRL). Die gewählte Spannung und Laufzeit war abhängig von der Größe und Porengröße des Agarosegels.

### **2.2.10.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

#### ***2.2.10.2.1 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA***

DNA Fragmente unter einer Größe von 400 bp wurden auf 6% igen Polyacrylamidgelen in einer vertikale Elektrophoresekammer (Mini V8, GIBCO BRL) mit 1 x TBE Puffer aufgetrennt. Die zu analysierende DNA wurde 1:1 mit Probenpuffer versetzt und mit Hilfe

einer Hamilton Spritze in die Geltasche pipettiert. Als Größenstandard dienten 600 ng einer 1 kb Leiter (GIBCO BRL). Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 200 Volt durchgeführt (Power Supply ST 606 T, Gibco BRL).

#### ***2.2.10.2.2 Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen***

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gelelektrophorese) nach Laemmli angewandt[31].

Die Proteinlösung wurde im Verhältnis 1:4 mit einem reduzierenden Probenpuffer (Roti Load 1, Roth) versetzt, die Proben 5 min bei 95°C denaturiert und mit Hilfe einer Hamilton Spritze in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich zu den Proben wurde ein geeigneter Größenstandard auf das Gel aufgetragen (Protein Marker Broad Range, New England Biolabs; Prestained Precision Protein Standard, Bio-Rad; Kaleidoscope Prestained Standard, Bio-Rad). Die Elektrophorese fand bei 150 – 200 V im Eisbad statt, bis das Bromphenolblau des Probenpuffers den unteren Gelrand erreicht hatte (Power Supply ST 606 T, Gibco BRL). Im Anschluss daran wurden die Gele, je nach erforderlicher Sensitivität, mit Coomassie oder Silber gefärbt oder für einen Western Blot verwendet.

### **2.2.11 Anfärbung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Makromolekülen**

#### **2.2.11.1 Anfärbung von DNA**

DNA Moleküle wurden mit Hilfe des Farbstoffes Ethidiumbromid, der sich zwischen die Basenpaare der DNA einlagert, in den Gelen sichtbar gemacht. Ethidiumbromid fluoresziert unter UV Licht orange und lässt so die DNA sichtbar werden. Der Farbstoff kann allerdings Strangbrüche verursachen, was die Nutzbarkeit der angefärbten DNA für weitere Experimente einschränken kann.

Polyacrylamidgele wurden nach Beendigung der Elektrophorese für ca. 1 min in ethidiumbromidhaltigem 1 x TBE Puffer gefärbt (1 µg/ml) und anschließend unter UV-Licht (Geldokumentationsanlage Gel Doc 2000, Bio-Rad) betrachtet und fotografiert. Bei

Agarosegelen war diese Behandlung aufgrund des bereits im Gel vorhandenen Ethidiumbromids (0,5 µg/ml) nicht notwendig.

## **2.2.11.2 Anfärbung von Proteinen**

### **2.2.11.2.1 Coomassie Färbung**

Für die Anfärbung von Proteinen im Mengenbereich 100 ng bis 1 µg wurde das Bio-Safe Coomassie Reagenz (Bio-Rad) verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel in 200 ml Millipore H<sub>2</sub>O gewaschen, um das SDS zu entfernen. Danach wurden 50 ml Reagenz zugegeben und das Gel für 1 h unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Gel in Millipore H<sub>2</sub>O bis zum gewünschten Grad entfärbt und auf einer Geldokumentationsanlage (Gel Doc 2000, Bio-Rad) fotografiert.

### **2.2.11.2.2 Silberfärbung**

Proteinmengen unter 100 ng wurden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Die Methode basiert auf einem Protokoll von Nesterenko et al.[32]. Alle Schritte wurden auf einem Schüttler in Glas- oder Plastikgefäßen in einem Volumen von 50 ml durchgeführt.

Im Anschluss an die Elektrophorese und der Abtrennung des Sammelgels wurden die Proteine zunächst mit einer Lösung aus 40% Methanol und 10% Eisessig im Trenngel fixiert. Danach wurde das Gel mit Millipore H<sub>2</sub>O dreimal kurz gespült, 5 min gewaschen und wiederum dreimal kurz gespült. Dann wurde das Gel 5 min in 50% Aceton in H<sub>2</sub>O vorbehandelt, gefolgt von 1 min Inkubation in Natriumthiosulfat. Nach einem erneuten H<sub>2</sub>O Waschschrift (siehe oben) wurde das Gel für 8 min mit Imprägnierlösung behandelt, kurz mit Millipore H<sub>2</sub>O gewaschen und in die Entwicklerlösung gelegt. Die Färbung wurde mit 1% Eisessig gestoppt. Anschließend wurde das Gel in Millipore H<sub>2</sub>O überführt und fotografiert (Gel Doc 2000, Bio-Rad).

## 2.2.12 Ligation

### 2.2.12.1 Topo TA Ligation

Für die Klonierung von PCR Produkten wurde der TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) nach Anweisung des Herstellers verwendet. Er macht sich die Eigenschaft vieler Taq Polymerasen zu Nutze, ein einzelnes, überhängendes Desoxyadenosin an die 3`- Enden der PCR Produkte zu synthetisieren. Der Plasmid Vektor (pCRII TOPO) liegt linearisiert vor und besitzt einzelne Desoxythymidin (T) Überhänge an den 3`- Enden, an die das Enzym Topoisomerase I kovalent gebunden ist. Gibt man nun den Vektor mit einem PCR Produkt zusammen, werden die komplementären Enden durch die Ligase-Eigenschaften der Topoisomerase miteinander verbunden.

### 2.2.12.2 Ligation mit T4-Ligase

Vektor und DNA Fragment wurden im Verhältnis 1:3 gemischt (Gesamtmenge ca. 100 - 300 ng), mit 2 µl 5 x T4-Ligasepuffer (inklusive ATP, GIBCO BRL) und 1 µl T4-Ligase (1U/µl; GIBCO BRL) versetzt und der Reaktionsansatz dann mit H<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt. Die Inkubation fand über Nacht bei 16°C statt. Ein Aliquot des Ligationsansatzes wurde für die Transformation verwendet.

## 2.2.13 Einschleusung von DNA in Zellen

### 2.2.13.1 Transformation

#### 2.2.13.1.1 Hitzeschock

Bei dieser Methode werden kompetente Bakterienzellen einem kurzen Hitzeschock ausgesetzt, wodurch die Zellmembran vorübergehend durchlässig für DNA Moleküle wird. TOP10 Zellen (Invitrogen) wurden auf Eis aufgetaut, mit 2 µl DNA versetzt und 10 min auf Eis

inkubiert. Danach wurden die Zellen für 30 sec einem Hitzeschock ausgesetzt (42°C, Wasserbad) und sofort wieder auf Eis überführt. Dann wurden 250 µl SOC Medium zugegeben und die Zellen 1 h bei leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden 10 - 100 µl der Bakteriensuspension auf LB-Amp Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen.

### **2.2.13.1.2 Elektroporation**

Zur Herstellung von elektrokompenten Zellen, wurde eine frisch vereinzelte Kolonie DH5α Zellen (Clontech) in 25 ml LB Medium über Nacht unter Schütteln (220 - 225 rpm) bei 37°C inkubiert. Diese Vorkultur wurde am nächsten Tag in 500 ml Miller Medium überführt und bei 37°C geschüttelt bis eine OD<sub>600nm</sub> von 0,6 erreicht war. Danach wurde die Kultur 1 h auf Eis gestellt, in sterile und gekühlte Zentrifugenbecher überführt und bei 4°C, 2800 x g 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 ml eiskaltem 10% Glycerol resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal mit abnehmenden Volumina an Glycerol (250 ml, 125 ml) wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 2 ml 10% Glycerol aufgenommen und in 50 µl Aliquots aufgeteilt. Die Zellzahl sollte auf ca. 3 x 10<sup>10</sup> Zellen/ml eingestellt sein. Die Reaktionsgefäße wurden 2 h auf Trockeneis gekühlt und dann bei - 80°C gelagert.

Für die Elektroporation wurden 50 µl elektrokompente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 3 µl Ligationsansatz gemischt und in eine vorgekühlte Küvette pipettiert (d = 0,2 cm). Die abgetrocknete Küvette wurden in das Gerät eingesetzt und ein elektrischer Impuls gegeben (2,5 V, 25 µFD, 200 Ω), durch den vorübergehend Poren in der Zellemembran entstehen und diese durchlässig für DNA macht.

### **2.2.13.2 Transfektion**

Für die Transfektion von Drosophila Schneider (S2) Zellen wurde die Kalziumphosphatpräzipitation verwendet. Bei dieser Methode wird DNA mit Kalziumchlorid vermischt, langsam zu einem phosphathaltigen Puffer gegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei bildet sich ein DNA-Kalziumphosphatpräzipitat, das nach Zugabe zu den Zellen über Endozytose oder Phagozytose aufgenommen wird. Zur Generierung stabil

transfizierter Zelllinien wird neben der rekombinanten DNA noch ein Resistenzgen enthaltendes Plasmid transfiziert.

Alle benötigten Substanzen und Plasmide wurden dem *Drosophila Expression System* (Invitrogen) entnommen. Die Herstellung des DNA-Kalziumphosphatpräzipitats wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt und dann zu 5 ml in der log-Phase befindlichen S2-Zellen (ca.  $4 \times 10^6$  Zellen/ml) gegeben. Die weitere Kultivierung und Selektion erfolgte ebenfalls gemäß der Anleitung. Die Proteinexpression der transfizierten Kulturen wurde entweder mit Hilfe eines Immunoblots getestet, oder durch Kultivierung in Protein-freiem Medium und anschließender SDS PAGE.

#### **2.2.14 Kultur von Bakterienzellen**

Zum Animpfen von Flüssigkulturen wurde, soweit nicht anders beschrieben, mit einer abgeflamten Impföse oder einer sterilen Pipettenspitze entweder eine Kolonie von einer Platte oder ein Aliquot einer Dauerkultur in 3 - 5 ml LB Medium überführt und ü. N. bei 37°C unter Schütteln (Incubator Shaker G25, New Brunswick Scientific Co. Inc.) inkubiert. Bei transformierten Kulturen wurde dem Medium noch ein entsprechendes Antibiotikum (Ampicillin 100 µg/ml) zugesetzt.

Zur Kultivierung auf Agarplatten wurde ein Aliquot einer Transformation auf die Platte pipettiert und mit Hilfe eines sterilen Spatels gleichmäßig verteilt. Material aus einer Dauerkultur wurde mit einer Impföse entnommen und in einem Strichmuster auf der Platte ausgestrichen.

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden 500 µl einer ü. N. Kultur mit 500 µl sterilem 87% Glycerin in einem Kryoröhrchen vermischt und bei – 80°C gelagert.

#### **2.2.15 Kultur von humanen Zelllinien**

Alle humanen Zelllinien wurden in RPMI 1640 Medium mit Glutamax (Invitrogen) inklusive 10% hitzeinaktiviertem FCS (Biochrom oder Invitrogen) bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zur Langzeitkultivierung wurden die Zellen in 25 cm<sup>2</sup> Flaschen (EasY Flask, Nunc) in einem Volumen von 5 – 8 ml gehalten und zweimal pro Woche 1:3 geteilt (Zellzahl vor Teilung ca.  $3 - 5 \times 10^5$ /ml). Wurden größere Zellmengen benötigt, erfolgte die Kultivierung in 75 cm<sup>2</sup>

(EasY Flask, Nunc) bzw. 185 cm<sup>2</sup> Flaschen (Nunclon Flask, Nunc) in Volumina von ca. 25 bzw. 70 ml. Einen Tag vor ihrer Verwendung wurden die Zellen nochmals 1:3 geteilt.

### 2.2.16 Kultur von Insektenzellen

Zur dauerhaften Kultivierung wurden Schneider 2 (S2) Drosophila Zellen (Invitrogen) in 5 ml Schneider's Insekten Medium (BioWhittaker) mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (komplettes Medium) in 25 cm<sup>2</sup> Flaschen kultiviert. Bei stabil transfizierten Zelllinien enthielt das Medium außerdem noch 400 – 500 µg/ml Hygromycin B (Roche). Die Zellen wurden zweimal pro Woche durch Teilung (i.d.R. 1:5) auf eine Zellzahl von ca. 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt und dabei in neue Flaschen überführt. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank (BK 6160, Heraeus Instruments) bei 23°C ohne zusätzliches CO<sub>2</sub>.

Um größere Mengen an scFv Antikörpern aufzureinigen zu können, wurden von den entsprechenden stabil transfizierten Zelllinien Suspensionskulturen angelegt. Eine 5 ml Kultur in komplettem Medium (log-Phase) wurde mit 4 Teilen frischem Medium (2% FCS) und 400 – 500 µg/ml Hygromycin B in eine 75 cm<sup>2</sup> Flasche überführt und vier Tage wachsen gelassen. Danach wurde die Kultur wiederum 1:5 geteilt (Medium mit 2% FCS) und dabei auf zwei 185 cm<sup>2</sup> Flaschen aufgeteilt. Nach 2 Tagen wurden beide Flaschen mit vier Teilen frischem Medium (2% FCS) und 0,1% Pluronic F68 (Invitrogen) in einen 2 l Erlenmeyerkolben auf einen Schüttler (Certomat S, B. Braun Biotech) überführt (RT, 130 rpm) und nach weiteren 2 Tagen die Produktion des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 100 mM Kupfersulfat (Endkonzentration 500 µM, Merck) induziert. Die induzierten Kulturen wurden nach 5 Tagen geerntet, indem die Zellen abzentrifugiert wurden (2000 rpm, 10 min). Der proteinhaltige Kulturüberstand kann steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt werden.

Um Gefrierkulturen anzulegen wurden die Zellen einer log-Phasen Kultur (ca. 4 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml) pelletiert (1000 x g, 2 - 3 min) in PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert und anschließend in Gefriermedium (45% konditioniertes komplettes Medium, 45% frisches komplettes Medium, 10% DMSO) auf eine Zellzahl von 1,1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlte Kryoröhrchen aliquotiert und in flüssigen Stickstoff gelagert. Um einen Gefrierstock in Kultur zu nehmen, wurde er zügig aufgetaut und die Zellen in eine 25 cm<sup>3</sup> Flasche mit 5 ml komplettem Medium transferiert. Nach 24 h wurden die Zellen zentrifugiert (1000 x g, 2 - 3 min), um das DMSO zu entfernen und anschließend in 5 ml frischem komplettem Medium so lange kultiviert, bis eine Zellzahl von ca. 1 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml erreicht war. Die weitere Kultivierung erfolgte dann wie oben beschrieben.

### 2.2.17 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die Aufreinigung der scFv-Antikörper aus dem Überstand der S2 Kulturen erfolgte mit Hilfe der *Immobilisierten Metallionen Affinitätschromatographie* (IMAC) über eine FPLC Anlage (BioLogic LP, Bio-Rad). Als Säulenmaterial diente 50 ml Chelating Sepharose Fast Flow in einer XK 26/20 Säule (Amersham Bioscience), die nach Anweisungen des Herstellers mit Nickelionen beladen wurde (100 mM NiSO<sub>4</sub> in Millipore H<sub>2</sub>O). Bei pH Werten zwischen 5,5 und 8,5 binden die Histidine des His-Tags der scFv an die chelatierten Nickelionen und die scFvs werden im Gegensatz zu anderen Proteinen auf der Säule zurückgehalten. Die Elution erfolgte kompetitiv durch einen imidazolhaltigen Puffer.

Der Kulturüberstand wurde einen Tag vor der Chromatographie auf die Molaritäten des Startpuffers eingestellt, ü. N. bei 4°C stehen gelassen und zusammen mit den Puffern am folgenden Tag filtriert (Durapore Membran Filter 0,22 µm, Millipore) und entgast. Der Auftrag auf die Säule erfolgte bei einer Flussrate von 4 ml/min. Im Anschluss wurde die Säule mit 8 Volumina Startpuffer gewaschen (Flussrate 8 ml/min), gefolgt von 1,4 Säulenvolumina eines Imidazolgradienten (0 - 25 mM, Flussrate 5 ml/min). Danach wurde das scFv Fragment mit 3 Volumina Elutionspuffer bei gleicher Flussrate eluiert. Zu Beginn, Mitte und Ende des Probenauftrags wurden jeweils 5 ml Fraktionen gesammelt, um die Effektivität der Bindung des scFvs an die Säule per Immunoblot überprüfen zu können. Außerdem wurde ab Beginn des Gradienten der gesamte Säulendurchfluss in 7 ml Fraktionen gesammelt und diejenigen mit der höchsten UV Absorption (280 nm) auf einem Proteingel analysiert. Fraktionen, in denen scFv enthalten war, wurden gegen PBS-T (pH 7,4) dialysiert (Slide-A-Lyzer, Pierce). Die Proteinlösungen wurden entweder bei 4°C aufbewahrt, oder mit 20% Glycerol (Merck) versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80°C gelagert.

### 2.2.18 Herstellung von *Helicobacter pylori* Lysaten

Die Bakterienzellen einer Agarplatte wurden mit einem Wattestäbchen in 500 µl Lysispuffer resuspendiert. Nach 2 - 3 Gefrier-, Tauzyklen in flüssigem Stickstoff wurden die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Nach Zugabe eines Protease Inhibitor Cocktails (Complete, Roche) wurden die Proteinextrakte entweder kurzzeitig bei 4°C gelagert, oder zur längeren Lagerung bei - 80°C eingefroren

## 2.2.19 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

### 2.2.19.1 Bradford Assay[33]

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen im Bereich von 0,1 - 1,0 mg/ml wurde der Standard Assay angewandt. Als Standard diente eine Konzentrationsreihe von BSA oder huFab Fragment (0,1 - 1 mg/ml) in dem Puffer, in dem auch die Proben vorlagen. Als Nullwert diente der reine Puffer. Alle Ansätze wurden doppelt hergestellt. Je 10 µl Puffer, Probe oder Standard wurden in ein Eppendorfgesäß pipettiert und mit 200 µl Bradford Reagenz (1:5 verdünnt mit H<sub>2</sub>O, Bio-Rad) versetzt. Die Ansätze wurden gemischt, 5 - 60 min stehen gelassen und dann luftblasenfrei in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (NUNC) mit planarem Boden überführt. In einem ELISA Reader (MRX, Dynex Technologies) wurde die OD bei 580 nm gemessen und die Proteinkonzentrationen anhand der Standardreihe ermittelt (Revelation Software, Dynatech Corporation).

Proteinkonzentrationen im Bereich von 8 - 80 µg/ml wurden mit dem Microassay ermittelt. Die Durchführung und Messung erfolgte im Prinzip wie oben, nur wurden 160 µl Puffer, Probe oder Standard mit 40 µl des konzentrierten Bradford Reagenz versetzt.

### 2.2.19.2 Bioanalyzer

Der Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) ermöglicht eine automatisierte Größen- und Konzentrationsbestimmung von Proteinen. Die Analyse erfolgt in einem Chip, der aus Glas besteht, in das mehrere untereinander verbundene Mikrokapillaren eingeätzt wurden. Diese münden auf der Oberseite in größere Öffnungen zum bequemen Einfüllen der Lösungen und Proben.

Vor einer Messung wurden die Kapillaren zunächst mit einem gelartigen Polymer und einem Fluoreszenzfarbstoff gefüllt und anschließend die entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Protein 200 Plus Assay, Agilent Technologies) vorbereiteten Proben und ein Größenstandard in die entsprechenden Chipöffnungen gefüllt. Die Proben werden dann nacheinander automatisch aus den Probenkapillaren in die Trennkapillare injiziert und durch den Siebeffekt des Polymers elektrophoretisch aufgetrennt. Anhand ihrer Fluoreszenz werden die einzelnen Probenbestandteile dann in Elektropherogramme und Gelbanden-ähnliche

Bilder übersetzt. Die Größenbestimmung erfolgt anhand einer Standardkurve, die aus den Laufzeiten und der Fluoreszenzintensität der Proteine des Größenstandards errechnet wird. Das kleinste und größte Protein („lower –“, und „upper marker“) des Standards befinden sich als interner Standard auch in den Proben. Zur relativen Konzentrationsbestimmung wird der „upper marker“ herangezogen, dessen Konzentration bekannt ist.

### **2.2.20 Biotinylierung**

Die aufgereinigten scFv wurden mit Hilfe des EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotinylierungskit (Pierce) biotinyliert. Zu den Proteinen wurde ein 20 facher molarer Überschuss an Biotin gegeben und die Reaktion für 2 h auf Eis oder 30 min bei RT inkubiert. Das ungebundene Biotin wurde anschließend durch Dialyse (Slide-A-Lyzer Kassetten, Pierce) gegen PBS-T entfernt. Um den Erfolg der Biotinylierung zu überprüfen, wurden 1 mg Streptavidin-gekoppelte, magnetische Partikel (Dynabeads M-280, Dynal) zu je 5µg scFv gegeben und für 30 min bei RT leicht geschüttelt. Nach mehreren Waschschritten mit PBS wurde die Suspension in PBS aufgenommen und elektrophoretisch aufgetrennt. Durch die Elektrophorese wurden die biotinylierten Proteine von den Partikeln getrennt und konnten durch eine Silberfärbung nachgewiesen werden.

### **2.2.21 Herstellung von Peptidarrays**

#### **2.2.21.1 Generierung der Peptidbibliothek**

Mit Hilfe einer entsprechenden Software (AG Schneider-Mergener, Institut für Medizinische Immunologie, Campus Mitte, Charité-Universitätsmedizin Berlin) wurden 5520 zufällige Peptidsequenzen einer Länge von 15 Aminosäuren generiert. Dazu wurden alle natürlich vorkommenden Aminosäuren bis auf Cystein verwendet. Cystein-haltige Peptide bilden erfahrungsgemäß oft Disulfidbrücken aus und die Aminosäure wird leicht oxidiert. Diese Eigenschaften können die Verfügbarkeit der betroffenen Peptide für die Antikörperbindung beeinträchtigen.

### 2.2.21.2 Programmierung des Spot-Roboters

Das Membranlayout wurde zunächst mit dem Programm LISA Vers. 1.571 (Library Software Architecture, AG Schneider-Mergener, Institut für Medizinische Immunologie, Campus Mitte, Charité-Universitätsmedizin Berlin) erstellt und die Dateien dann in die Autospot XL Software des Spotters (ABIMED) importiert.

Die 5520 Peptide wurden auf 10 einzelne Felder (Trays) verteilt, in denen die Zahl und Anordnung der Spots (jeder Spot entspricht einem Peptid) jeweils variabel ist. Die Anordnung folgt jedoch stets einem gitterartigen Raster. Die Nummerierung der Felder erfolgt von oben nach unten und von links nach rechts entsprechend der Bewegungsrichtung der Spotternadel. Eine solche Unterteilung der Membran erleichtert die Justierung der Spotnadel nach den Waschsritten, bei denen sich die Zellulosemembran verziehen kann, und später die Zuordnung positiver Spots zu der jeweiligen Peptidsequenz. Es wurden 9 Trays mit 558 Spots (18 x 31, Breite x Länge) und ein Tray mit 498 Spots (18 x 27, + 12) angelegt. Das letzte Tray enthielt außerdem noch 62 Kontrollspots mit der Sequenz des CD30 Epitops, an das der BerH2-Antikörper bindet. Der Abstand zwischen den einzelnen Spots betrug 2,8 mm. Am linken Rand der Membran wurde ein zusätzliches Feld mit je zwei Spots pro verwendeter Aminosäure eingerichtet. Jede Aminosäure wurde zunächst in dieses Feld gespottet, bevor sie in die eigentlichen Trays aufgetragen wurde, um die Abgabe des richtigen Volumens aus der Nadel zu gewährleisten. Insgesamt wurden zwei Membranen, jeweils mit der gleichen Peptidbibliothek, hergestellt.

### 2.2.21.3 Herstellung der CAPE Membran

Für die Synthese der Zufallsbibliothek wurde eine regenerationsfähige CAPE (Cellulose-amino-hydroxy-propyl-ether)-Membran hergestellt, bei der die Hydroxylgruppen der Zellulose zu einem Aminohydroxypropylderivat verethert werden, mit dem die Peptide über ihre Carboxylgruppe sehr stabil an die Membran gebunden werden können[34]. Alle im Folgenden beschriebenen Inkubationen wurden auf einem Schüttler durchgeführt und für alle Waschschrte wurden Volumina von ca. 50 ml verwendet. Filterpapier (Whatman 50 Zellulose) wurde auf die Maße von ca. 19 x 29 cm zurechtgeschnitten und in eine Metallwanne mit Deckel gelegt. 400 mg Paratoluolsulfonsäure (PTS) wurden in 50 ml Methanol gelöst und auf die Membran gegeben. Die Membran wurde 3 min in der Lösung

inkubiert und dann für 30 min in der auf einem Heizkissen (50°C) stehenden Wanne gut getrocknet. Anschließend wurde eine Lösung aus 8 g N-(2,3-epoxypropyl)-phthalimid in 50 ml 1,4-Dioxan in der Wanne auf 80 °C erhitzt, eine Lösung aus 400 mg PTS in 10 ml 1,4-Dioxan zugegeben und die Membran wurde 30 min in der heißen Lösung, und weitere 2,5 - 4,5 h bei RT inkubiert. Im Anschluß daran wurde die Membran 3 x mit Dioxan und 2 x mit Ethanol (96%) gewaschen, dann in eine ca. 10% Hydrazinhydratlösung in Ethanol (60 ml) überführt und 5 h inkubiert (RT). Zum Schluß wurde die Membran 2 x mit Ethanol, 3 x mit Dimethylacetamid (DMA), 2 x mit Ethanol und 2 x mit Ether gewaschen und an der Luft getrocknet. Zur Lagerung kann die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und bei – 20°C aufbewahrt werden.

#### **2.2.21.4 Kopplung der Membran mit $\beta$ -Alanin**

Als Linker, der die Spots definiert und die nachfolgend synthetisierten Peptide weiter in den Raum ragen lässt, wurde zunächst  $\beta$ -Alanin an die funktionalisierte Membran gekoppelt. Dazu wurde eine 0,3 M  $\beta$ -Alanin Lösung entsprechend dem einprogrammierten Raster auf die Membran gespottet. Das Volumen jedes Spots betrug 0,3  $\mu$ l. Die Kopplung wurde zweimal im Abstand von 15 min durchgeführt, um eine vollständige Benetzung sicher zu stellen.

Zur Überprüfung der Effizienz der  $\beta$ -Alanin-Kopplung wurde am Rand der Membran an drei Stellen per Hand  $\beta$ -Alanin Lösung (2 x jeweils ca. 5  $\mu$ l im Abstand von 15 min) aufgetragen, die Spots mit einem Locher ausgestanzt und jeweils in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Jedes Filterstück wurde 5 x mit 1 ml DMA gewaschen (3 min unter Schütteln) und dann zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe, die als Maß für die Beladung dient, in 1 ml 20% Piperidin in DMA 20 min geschüttelt. Danach wurde der Überstand abgenommen, in eine Plastikküvette überführt und die OD bei 302 nm gegen 20% Piperidin in DMA bestimmt.

Die Beladung errechnet sich aus  $OD \times 1000/8,1$  ( $c = E/d \times \epsilon$ ) und wird in nmol/Spot angegeben. Der Wert sollte für eine CAPE Membran 20 - 80 nmol/Spot betragen.

#### **2.2.21.5 Acetylierung**

Die Acetylierung dient dazu, die nach der Kopplung von  $\beta$ -Alanin noch freien Aminofunktionen der Membran zu blockieren. Dies stellt sicher, dass die nachfolgende

Peptidsynthese nur auf den mit  $\beta$ -Alanin gekoppelten Spots stattfindet. Die Aminogruppe des  $\beta$ -Alanins selbst ist durch eine Fmoc-Gruppe geschützt.

Im ersten Schritt wurde die Membran mit der  $\beta$ -Alanin Seite nach unten für 2 - 3 min in eine Metallwanne gelegt, die ca. 50 ml 2% Acetanhydrid in DMA enthielt. Danach wurde die Lösung abgegossen, die Membran umgedreht und für 30 min in einer Lösung aus 2% Acetanhydrid und 1% N-Ethyldiisopropylamin in DMA geschüttelt. Es folgten 2 dreiminütige Waschschriffe mit DMA. Im Anschluß daran wurde die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten, um die Aminogruppe des  $\beta$ -Alanin für die Reaktion mit der ersten Aminosäure bereit zu machen.

#### **2.2.21.6 Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe**

Nach der  $\beta$ -Alanin Kopplung und nach jedem weiteren Aminosäure-Kopplungsschritt an die Membran muß die Fmoc-Schutzgruppe am Aminoende der Aminosäure entfernt werden, um die Bindung des nächsten Moleküls zu ermöglichen. Die Schutzgruppe ist nötig, damit die einzelnen Aminosäuren nicht bereits in der Stammlösung miteinander reagieren. Alle Schritte wurden unter einem Abzug auf einem Schüttler in einer Metallwanne mit Lösungsvolumina von ca. 50 ml durchgeführt.

Die Membran wurde zunächst 3 x für 3 min in DMA gewaschen. Dann folgte die Abspaltung der Fmoc-Gruppe durch 20% Piperidin in DMA (20 min). Danach wurde erneut 5 x mit DMA gewaschen, gefolgt von zwei Waschschriffen mit 96% Ethanol. Dann wurde die Membran kurz in einer 0,02% igen Bromphenolblaulösung inkubiert. Bromphenolblau färbt die freien Aminogruppen der Spots blau an und bietet so die Möglichkeit die Effektivität der Fmoc Abspaltung zu überprüfen. Der überschüssige Farbstoff wurde mit zwei weiteren Ethanol Waschschriffen entfernt und die Membran nach zweimaligem Spülen in Dimethylether an der Luft getrocknet.

#### **2.2.21.7 Kopplung von Aminosäuren an die Membran**

Alle Peptide werden gleichzeitig Aminosäure für Aminosäure an der Membran aufgebaut. Im ersten Schritt wird also von allen Peptiden die erste Aminosäure gekoppelt, im zweiten Schritt die zweite Aminosäure usw. bis zur fünfzehnten Aminosäure. Um die Kopplung der einzelnen Aminosäuren sicherzustellen wird jeder Schritt zweimal hintereinander ausgeführt. Zwischen

den einzelnen Schritten wird, wie unter 2.2.21.6 beschrieben, die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vorgenommen.

### **2.2.21.8 Abspaltung der Seitenschutzgruppen**

Die für die Peptidsynthese verwendeten Aminosäuren besitzen nicht nur die Fmoc-Schutzgruppe am Aminoende, sondern auch Schutzgruppen an ihren reaktiven Seitenketten. Diese Gruppen werden am Schluss der Synthese abgespalten. Dazu wird die Membran zunächst für 30 min in 90% TFA-Lösung gelegt. Die Säure wird durch viermaliges Waschen mit Dichlormethan (DCM) entfernt und die Membran dann für weitere 2,5 h in 50% TFA-Lösung inkubiert. Nach vier Waschschrinen mit DCM und dreimaligem Waschen mit Dimethylacetamid wird die Membran entweder mit Hilfe von Ethanol und Ether getrocknet (vgl. 2.2.21.6) oder durch ausgiebiges Waschen mit TBS auf die Inkubation mit Antikörpern vorbereitet.

### **2.2.22 Immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten**

Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Schnitte wurden zunächst für 2 x 10 min in eine Küvette mit Xylol gestellt und anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe (90%, 80%, 70%, Tris-Puffer) rehydriert. Danach wurden sie 2 min in Citratpuffer im Dampfdrucktopf gekocht, unter fließendem aqua dest. abgekühlt und mit Tris-Puffer gespült. Zur Blockierung endogener Peroxidasen wurden die Schnitte 2 x 15 min mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in H<sub>2</sub>O), und zur Blockierung endogener Biotinmoleküle 2 x 10 min mit dem *Avidin-Biotin Blocking System* (DAKO) behandelt. Anschließend folgte eine 15 minütige Inkubation mit den jeweiligen, in TNB-Puffer (PerkinElmer Life Science) verdünnten, biotinylierten scFv-Antikörpern. Die Signale wurden mit dem *Catalyzed Signal Amplification System* (CSA, DAKO) verstärkt und durch ein Chromogensubstrat detektiert (SIGMA FAST™ 3,3'-Diaminobenzidin Tabletten, Sigma). Anschließend wurden die Schnitte zur Anfärbung der Zellkerne 1 min in Hämalaunlösung inkubiert, mit lauwarmem Leitungswasser gespült und gedeckelt.

Für die Doppelmarkierungen wurden die Schnitte im Anschluss an die erste Signalentwicklung erneut 2 min in Citratpuffer im Dampfdrucktopf gekocht, abgekühlt und mit Puffer gespült. Danach wurden die Schnitte 30 min mit dem nächsten entsprechend verdünnten (ChemMate Antibody Diluent, DAKO) primären Antikörper inkubiert. Die

Detektion des gebundenen Antikörpers erfolgte über einen Alkalische Phosphatase konjugierten Brückenantikörper (30 min) gefolgt von einem anti-Alkalische Phosphatase Antikörper (30 min, beide ChemMate™ Detection Kit APAAP Mouse, DAKO), der ebenfalls mit Alkalischer Phosphatase verbunden (APAAP) ist. Nach Zugabe des Substrates (30 min, ChemMate™ Detection Kit APAAP Mouse, DAKO) entsteht ein roter Farbniederschlag, anhand dessen diese zweite Färbung von der ersten (brauner Farbniederschlag) unterschieden werden kann. Bei der Färbung mit dem MUM1 Antikörper wurde durch eine Wiederholung der Brücke/ APAAP Schritte (jeweils 10 min) eine Verstärkung der Signale erreicht.

Gefrierschnitte wurden vor dem Färben langsam aufgetaut, 5 min in Aceton fixiert und getrocknet. Die Blockierung endogener Peroxidase erfolgte durch eine Inkubation (30 min, 37°C) in vorgewärmtem Glucoseoxidase-Puffer. Die weitere Färbung wurde analog dem Protokoll für Paraffinschnitte durchgeführt, außer dass zum Spülen Tris-Puffer ohne Tween verwendet wurde.

Antikörper	Verdünnung
scFvs	1 µg/ml
MUM1 Antikörper (Santa Cruz)	1:20
Anti-IgA Antikörper (DAKO)	1:20.000
Anti-IgD Antikörper (DAKO)	1:200
Anti-IgE Antikörper (DAKO)	1:400
Anti-IgG Antikörper (DAKO)	1:1000
Anti-IgM Antikörper (DAKO)	1:400

### 2.2.23 Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) Messung

Für jeden Versuchsansatz wurden ca.  $1 \times 10^6$  Zellen der gewünschten Zelllinie in ein FACS Rörchen pipettiert (5 ml Polystyrene Round Bottom Tube, Falcon) und 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert (Minifuge RF, Heraeus). Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 100 µl Primärantikörper (in PBS) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 - 20 min bei RT wurden die Zellen erneut zentrifugiert und mit 2 ml PBS insgesamt 3 x gewaschen. Diese Schritte wurden, falls erforderlich, mit einem Sekundärantikörper wiederholt. Zuletzt wurde mit einem PE-(Phycoerythrin) markierten Antikörper (DAKO) inkubiert, die Zellen danach 1 x gewaschen und in 200 - 400 µl PBS aufgenommen. Die Messung erfolgte in einem FACSort (Becton Dickinson).

### 2.2.24 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die benötigten Löcher einer 96 - Lochplatte (Nunclon Surface, Nunc) wurden mit 100 µl Poly-L-Lysin (50 µg/ml, Boehringer Mannheim) für 2 h bei 37°C inkubiert. Die überschüssige Lösung wurde entfernt und die Platte 1 x mit PBS gewaschen. Danach wurden 1 – 3 x 10<sup>5</sup> Zellen in PBS pro Loch aufgetragen und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert (Minifuge RF, Heraeus). Dann wurde die Platte 1 x mit PBS gewaschen und die Zellen mit je 100 µl 0,05% Glutaraldehyd (in PBS, Sigma) für 30 min bei RT fixiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS-T erfolgte eine Blockierung der restlichen freien Oberfläche mit je 200 µl 1,5% BSA (in PBS-T, Sigma) für 1 h bei RT oder ü. N. bei 4°C. Die Platte wurde 3 x mit PBS-T gewaschen und dann für 30 - 60 min mit 50 - 100 µl des Primärantikörpers (in PBS-T) inkubiert. Je nach Primärantikörper folgten Inkubationen mit einem Sekundärantikörper und einem anti-Maus AP-Konjugat oder nur einem anti-Maus AP-Konjugat (je 30 - 60 min, RT), an die sich die Detektion der AP-Aktivität anschloss (SIGMA FAST™ pNPP Substrat Tabletten, Sigma). Die OD 405 nm wurde in einem ELISA Reader (MRX, Dynex Technologies) gemessen.

### 2.2.25 Immunoblot[35]

Die nachzuweisenden Proteine wurden zunächst elektrophoretisch aufgetrennt. Eine Polyvinyliden Difluorid (PVDF) Membran (Hybond-P, Amersham Bioscience) und Whatman Filterpapier wurden auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten. Die Membran wurde kurz in Methanol aktiviert, mit Millipore H<sub>2</sub>O gespült und zusammen mit dem Trenngel für einige Minuten in Transferpuffer äquilibriert. In einer Schale wurde der Blot dann in der Reihenfolge Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier zusammengesetzt und zwischen zwei Schwammstücke gelegt. Das Sandwich wurde dann im Bloteinsatz einer Mini V8 Elektrophoresekammer (GIBCO BRL) fixiert und in die Kammer gestellt. Der Transfer der Proteine fand entweder ü. N. bei 4°C und 40 mA oder für 1,5 h im Eisbad bei 200 mA statt (ST 606 T, Gibco BRL).

Danach wurden potenzielle unspezifische Antikörperbindungstellen auf der Membran wahlweise ü. N. bei 4°C oder 1 h bei RT mit Blockierungspuffer abgesättigt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 2 h bei RT. Anschließend wurde die Membran 3 x 10 min mit PBS-T gewaschen und dann für 1 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert.

Alle verwendeten Antikörper wurden in Blockierungspuffer verdünnt. Die Verdünnungen sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Zum Nachweis der Antikörperbindung wurde, nach weiteren drei Waschschrinen, das *ECL Western Blotting Detection Reagents* (Amersham Biotech) gemäß dem Protokoll des Herstellers verwendet. Entsprechende Signale waren nach ca. 20 – 60 sec auf dem Film sichtbar.

Antikörper	Verdünnung
scFvs	0,5 µg/ml
Polyklonaler Kaninchen Anti-Helicobacter pylori Antikörper (DAKO)	1:1000
Anti-V5 Antikörper (Invitrogen)	1:5000
Anti-Maus-HRP Antikörper (Amersham Biotech)	1:2000
Anti-Maus-HRP Antikörper (DAKO)	1:10.000
Anti-Kaninchen-HRP Antikörper (Amersham Biotech)	1:1000
Streptavidin-HRP (NEN Life Science)	1:1000

HRP: Meerettich Peroxidase

### 2.2.26 Detektion von Bindungsdomänen auf Proteinfiltren

Bei den hier verwendeten Proteinfiltren handelt es sich um PVDF-Membranen, auf die mittels Robotertechnologie eine Expressionsbank aus humanem, fötalem Gehirngewebe aufgebracht wurde. Auf jedem Filter befinden sich 13.824 Klone, jeweils im Doppel gespottet. Da das Set aus zwei Filtren besteht, können also 27.648 Klone der redundanten cDNA Bank untersucht werden. Das von Konrad Buessow (MPI für molekulare Genetik, Berlin) entwickelte Filterset wird vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD) vertrieben (<http://www.rzpd.de>).

Die Behandlung der Filter erfolgte wie unter 2.2.25 beschrieben. Zur Auswertung wurde das Radiogramm auf eine Matrize gelegt, mit deren Hilfe den Signalen Koordinaten zugeordnet werden konnten. Durch Eingabe dieser Werte in eine Datenbank des RZPDs wurden dann die zugehörigen Klonnummern ermittelt die Klone bestellt, kultiviert und die DNA sequenziert. Zur Identifizierung der Sequenzen wurden verschiedene Datenbanken verwendet.

### 2.2.27 Detektion von Bindungsdomänen im Peptidarray

Die trockene Membran wurde 10 min mit Ethanol befeuchtet, mehrmals mit TBS gewaschen und für 1 h bei RT auf einem Schüttler in Blockierungspuffer inkubiert. Danach wurde die Membran auf einer Lage Papiertücher leicht abgetrocknet und mit 15 ml Meerrettich-Peroxidase markiertem anti-V5 Antikörper (Invitrogen; 1:2000 in Blockierungspuffer) oder anti-His Antikörper (Qiagen; 1:2000 in Blockierungspuffer) in einer Plastikfolie eingeschweißt für 1 h bei RT geschüttelt. Nach drei zehnminütigen Waschschritten mit TBS-T wurde gebundener Peroxidase markierter Antikörper durch Zugabe von *SuperSignal West Dura Substrat* (Pierce) auf einem *Lumi Imager* (Boehringer Mannheim) nachgewiesen. Die Expositionszeiten betragen 5 - 15 min. Nach erneutem Waschen mit TBS-T und 1 h Inkubation in Blockierungspuffer wurde die Membran in 15 ml scFv Lösung (10 µg/ml in Blockierungspuffer) über Nacht bei 4°C geschüttelt, anschließend wieder gewaschen und wie oben beschrieben mit dem Peroxidase markierten anti-V5 Antikörper bzw. mit dem anti-His Antikörper inkubiert und die Signale detektiert.

Um die gebundenen Antikörper von der Membran zu entfernen und diese so für das nächste Experiment zu regenerieren wurde sie 3 x 30 min bei 50°C auf einem Schüttler in Regenerierungspuffer gewaschen. Nach ausgiebigem Spülen mit TBS konnte sie erneut für ein Experiment verwendet werden. Zur längeren Lagerung bei – 20°C wurde die Membran 2 x 10 min in Ethanol und 2 x 2 min mit Ether gewaschen und nach Trocknung an der Luft eingeschweißt.

Die Auswertung der Signale erfolgte durch Armin Weiser (Institut für Medizinische Immunologie, Campus Mitte, Charité-Universitätsmedizin Berlin) mit Hilfe der Software Genespotter (MicroDiscovery, Berlin) Dazu wurde zunächst ein Raster über die vom *Lumi Imager* generierte Bilddatei der inkubierten Membran gelegt, das die Position jedes Spots (Peptids) definiert. Anhand dieses Rasters kann das Programm dann in den folgenden Schritten die Signalintensitäten der einzelnen Spots in unterschiedlichen Experimenten miteinander vergleichen und signifikante Unterschiede z. B. zwischen Inkubationen mit und ohne scFv erkennen. Die Position der Spots ist über die Software mit der zugehörigen Sequenzinformation verbunden. Traten Signale auf, die sich zwischen den Kontrollen und den Experimenten mit scFv unterschieden, also auf eine spezifische Bindung des scFv an ein Peptid hinwiesen, konnte dessen Sequenz ermittelt und für Datenbanksuchen verwendet werden.