

2 Material

2.1 Geräte und sonstige Hilfsmittel

μRP-C2/C18-Säule	Amersham Pharmacia, Freiburg, D
Beckman Avanti J-25 Zentrifuge	Beckman Instruments, München, D
Brutschrank Steri-Cult 200	Forma Scientific, Göttingen, D
C18-Vorsäule (300 μm x 5 mm)	Dionex, Idstein, D
Cell-Roll System	Integra Biosciences, Chur, CH
Dialyseschläuche, Visking (20/32 N° 0653)	Roth, Karlsruhe, D
DNA-Gellaufkammer	BioRAD Laboratories, München, D
Dounce-Homogenisator	Wheaton, Millville NJ, USA
Durchflusszytometer <i>FACS Calibur</i>	Becton Dickinson, San Jose, USA
Econo Chromatographie-Säulen	BioRAD, München, D
Filmkassetten <i>Hyper cassette</i>	Amersham Pharmacia, Freiburg, D
Imager <i>High Performance CCD</i>	Appligene Oncor, Illkirch, F
Geltrockner	BioRAD, München, D
Gene Pulser System	BioRAD, München, D
Glaskapillare	Protana, Odense, DK
Gellaufkammer Horizon 20-25	GIBCO, Karlsruhe, D
HPLC-System SMART	Pharmacia, Freiburg, D
Megafuge 1.0 R	Heraeus Christ, Osterode, D
Mikrokapillar-HPLC-System	Micromass, Manchester, UK
Miniperm classic Kit 12,5 kDa	VivaScience/Sartorius AG, Göttingen, D
MIDI-MACS MS/RS-Säule	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, D
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe, D
Octo-MACS	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, D
PepMap C18-Säule	Dionex, Idstein, D
Power Pack P25	Biometra, Göttingen, D
Power Pack 300	BioRAD, München, D
PCR-System Gene Amp 2400	Perkin Elmer, Überlingen, D
Q-Tof Massenspektrometer	Micromass, Manchester, UK
Quarzküvetten	Hellma, Mühlheim, D
Schlauchpumpe Minipuls 2	Gilson-Abimed, Langenfeld, D
Sephadex <i>spin columns</i>	Roche, Mannheim, D
Spektrophotometer DU 640	Beckman Instruments, München, D
Stratalinker 2400	Stratagene, La Jolla, USA

Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus Christ, Osterode, D
Tecan Spektrophotometer	Tecan, Crailsheim, D
Transilluminator Appligene oncor	Appligene Oncor, Illkirch, F
Ultrathurax RX T25	Janke & Kunkel KIKA-Labortechnik, Köln, D
Ultrazentrifuge L-60	Beckman Instruments, München, D
Untertischzentrifuge Varifuge 3.0 R	Heraeus Christ, Osterode, D
Western-Blot Semidry	Biometra, Göttingen, D

2.2 Chemikalien und allgemeines Material

alfa- ³² P-dCTP	NEN, Boston, USA
Acetonitril (<i>isocratic grade</i>)	Merck, Darmstadt, D
Acrylamid	BioRAD, München, D
Acridinorange	Sigma Aldrich, München, D
Bacto Agar	Sigma Aldrich, München, D
Bacto Trypton	Difco Laboratories, Detroit, USA
Benchmark	Gibco, Karlsruhe, D
BSA Fraktion V	Roche, Mannheim, D
β-Estradiol	Sigma Aldrich, München, D
Biomax-50	VivaScience/SartoriusAG, Göttingen, D
Bradford-Reagenz	BioRAD, München, D
Cell-Protect	VivaScience/SartoriusAG, Göttingen, D
Centricon Concentrators YM-10	Millipore, Bedford, USA
Citrat	Merck, Darmstadt, D
CHAPS	Roche, Mannheim, D
G418	Gibco, Karlsruhe, D
DEAE-Cellulose (DE-52)	Whatman, Maidstone, Kent, UK
DEPC	Sigma Aldrich, München, D
dNTP	Roche Biosystems, Branchburg, USA
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf, Hamburg, D
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, München, D
Entwickler	Agfa, Mortsel, Belgien, D
FCS	Biochrom, Berlin, D
Ficoll (ρ= 1,077 g/ml)	Biochrom, Berlin, D
Glutamin	Gibco, Karlsruhe, D
Hybridisierungslösung <i>Express Hyb</i>	BD Clontech, Palo Alto, USA

Film Biomax MS	Kodak Eastman, Rochester, USA
Fixierer	Agfa, Mortsels, B
Mass Ruler	MBI Fermentas, Heidelberg, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BioRAD, München, D
PBS	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, D
PFU-Polymerase	Stratagene, Heidelberg, D
Penicillin	Gibco, Karlsruhe, D
Poros 50 R2 <i>reversed phase packing</i>	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Proteaseinhibitor <i>complete</i>	Roche, Mannheim, D
Pyruvat	Gibco, Karlsruhe, D
Rainbow TM -Marker	Amersham Pharmacia, Freiburg, D
Restriktionsenzyme	Amersham Pharmacia, Freiburg, D
Sephadex-Säulen	Roche, Mannheim, D
Sartolab-P20 plus	Sartorius, Goettingen, D
STI 571 (Imatinib)	Novartis, Basel, CH
Streptomycin	Gibco, Karlsruhe, D
suc-LLVY-AMC	Bachem, Heidelberg, D
Taq-Polymerase	BD Clontech, Palo Alto, USA
TEMED	BioRAD, München, D
TFA (für die UV Spektroskopie)	Fluka, Buchs, CH
Triton-X-100	Serva, Heidelberg, D
Trizol	Gibco, Karlsruhe, D
Trypanblau	Sigma Aldrich, München, D
T4-DNA-Ligase	New England BioLabs, Schwalbach, D
Venimmun	Centeon Pharma GmbH, Marburg, D
Wasser (Lichrosolv, HPLC- <i>grade</i>)	Merck, Darmstadt, D

Alle anderen Materialien wurden in der Regel von Fluka, Merck, Roth oder Sigma bezogen.

2.3 Membranen

Hybond N ⁺	Amersham, Uppsala, S
Nitrocellulose Membran	Schleicher und Schuell, Dassel, D
<i>Multiple tissue</i> Northern	BD Clontech, Palo Alto, USA
<i>Human tumor</i> Northern	BD Clontech, Palo Alto, USA

2.4 Kits

Plasmid Mini- und Maxi Kit	Qiagen, Hilden, D
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
ECL Western Blotting Kit	Amerham Biosciences, Freiburg, D
GeneAmp RNA PCR Kit	Perkin Elmer, Überlingen, D
PGEM-T Kloning-Kit	Promega, Mannheim, D
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, D
Labeling-Kit DecaPrime II™	Ambion, Austin, USA
cDNA synthesis system kit	Roche, Mannheim, D
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, D

2.5 Vektoren

PGEM-T easy	Promega, Mannheim, D
PCRScript™ Amp Sk(+)	Stratagene, Heidelberg, D
pCDNA3.1 (Neo)	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.6 Bakterien

<i>E.coli</i> XL-1 Blue	Stratagene, Heidelberg, D
-------------------------	---------------------------

2.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide sind in 5'- 3'Orientierung angegeben. Die Synthese erfolgte durch die BioTeZ Berlin-Buch GmbH (Berlin, D).

HLA-B8 <i>sense</i> Primer	GGATCCGAGGATGCTGGTCATGGCGCCC
HLA-B8 <i>antisense</i> Primer	GGATCCTCAAGCTGTGAGAGACACATCAG
LMO4 <i>sense</i> Primer	TGGTGAATCCGGGCAGCAGC
LMO4 <i>antisense</i> Primer	TGCATTACTCTGACCTTTTAGCAG
β2-Mikroglobulin <i>sense</i> Primer	CCAGCAGAGAATGGAAAGTC
β2-Mikroglobulin <i>antisense</i> Primer	GATGCTGCTTACATGTCTCG

pCRScript <i>sense</i> Primer	CAGCTATGACCATGATTACGCC
pCRScript <i>antisense</i> Primer	CTATAGGGCGAATTGGGTACC

2.8 Synthetische Peptide und MHC-Tetramere

Alle synthetischen Peptide wurden in der höchst möglichen Reinheitsstufe (>95%) bezogen (WITA GmbH, Berlin, D). Die lyophilisierten Peptide wurden bei 4°C gelagert und vor Versuchsbeginn entsprechend ihrer Hydrophobizität in HPLC-*grade* Wasser oder 50% ACN gelöst, um eine 1 mM Lösung herzustellen. Die weitere Verdünnung der Peptidlösung erfolgte in HPLC-*grade* Wasser.

Der rekombinante MHC-Tetramerstandard zur Quantifizierung von immunpräzipitierten MHC-Klasse-I-Molekülen wurde von Oliver Schoor (Eberhard-Karls-Universität Tübingen, D) zur Verfügung gestellt.

2.9 Antikörper

2.9.1 FACS-Antikörper

Anti-human HLA-A3	One Lambda, Canoga Park, USA
Anti-human HLA-A2-FITC	BD Pharmingen, San Diego, USA
Anti-human HLA-B8-FITC	One Lambda, Canoga Park, USA
Anti-Maus IgG + IgM-FITC	Jackson Immuno Research, Baltimore, USA
APC Ratte IgG2a κ Isotypkontrolle	Pharmingen, San Diego, USA

2.9.2 Western-Blot-Antikörper

Anti-20S LMP7	Dianova, Hamburg, D
Anti-20S β 1 (Y)	Dianova, Hamburg, D
Anti-Maus IgG-HRP	Promega, Madison, USA
Anti-Kaninchen IgG	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Anti- β 2-Mikroglobulin	Abcam, Cambridge, UK
Anti-BCR sc-885	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Anti-HC-10	(121; 122)

2.9.3 Antikörper aus Hybridomen

Erkanntes Antigen:	Hybridomlinie:
HLA-A2.1	BB7.2, ATCC HB-82 (<i>mouse anti-human IgG2b</i> , Stamm: Balb/c { <i>B-cell</i> } : Balb/c { <i>Myeloma</i> }), (123)
HLA-A3	GAP-A3, ATCC HB-122 (<i>mouse anti-human IgG2a kappa</i> , Stamm: Balb/c : Balb/c), (124)
HLA-A,B,C	W6/32, ATCC HB-95 (<i>mouse anti-human IgG2</i> , Stamm: Balb/c: Balb/c), (125)

2.9.4 Sonstige Antikörper

Anti-CD16	BD Pharmingen, San Diego, USA
Anti-CD32	BD Pharmingen, San Diego, USA
Anti-CD64	BD Pharmingen, San Diego, USA
Ratte Anti-Maus IgG2a+b MicroBeads	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, D

2.10 Zelllinien

K562 (ATCC CCL-243)
 T2 (174 x CEM.T2) (ATCC CRL-1992)
 T47D (ATCC HTB-133)
 LCL721 (126)
 LCL721.174 (127; 128)
 JA2/K^b (129)

2.11 Humane Zellen und Gewebe

Die Analyse des Peptidrepertoires von Leukämiepatientenzellen erfolgte sowohl aus frisch leukapherisierten Zellen als auch aus kryokonservierten Stammzellpräparaten, die zu Forschungszwecken freigegeben worden waren (zur Verfügung gestellt durch die Ärzte des Virchow-Klinikums Berlin, D und des Uniklinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt a.M., D). Diese sind in Tabelle 1 aufgelistet. Zellmaterial aus dieser Patientengruppe und CML-Zellen von zwei weiteren Patienten aus Blastenkrise (BK2) bzw. chronischer Phase CML (CP2) wurden darüber hinaus für Proteasom-Expressionsanalysen eingesetzt.

Tabelle 1: Übersicht über Leukämiepatientenzellen für die MHC-Klasse-I-Peptidanalyse:

Patient	Diagnose und Therapiestatus*	Zellmenge	HLA-Genotyp des CML-Patienten	
CP1	CML chronische Phase	10^{10}	HLA-A3	n.d.
CP/AP	CML chronische Phase, (Übergang zur akzelerierten Phase nicht ausgeschlossen)	10^{10}	HLA-A3 HLA-32	HLA-B7 HLA-B13
CP3	Chronische Phase CML (untherapiert)	10^{10}	HLA-A2 HLA-34	HLA-B8 HLA-B44
BK1	CML Blastenkrise (untherapiert)	10^{11}	HLA-A2 HLA-A3	HLA-B7 HLA-B35
AML1	AML	10^{11}	HLA-A2 HLA-A24	HLA-B7 HLA-B51

* Für einige Patienten lagen keine Angaben über den Therapiestatus vor.

Die für RNA-Expressionsanalysen eingesetzten PBMCs gesunder Spender wurden aus frisch entnommenem Vollblut von Laborpersonal isoliert oder aus *Buffy-Coats* gewonnen, die über den DRK Blutspendedienst Wannsee (Berlin, D) bezogen wurden. Die vergleichende LMO4-Expressionsanalyse zwischen STI 571 behandelten und alternativ therapierten CML-Patienten wurde an mRNA durchgeführt, die von Dr. Mapara (Virchow-Klinikum, Berlin, D) zur Verfügung gestellt wurde.

Milzzellen für mRNA-Experimente und MHC-Klasse-I-Peptidanalysen wurden aus Milzgewebeproben von Organspendern gewonnen, die zu Forschungszwecken freigegeben worden waren (Dr. Mehlitz, Abteilung für Transplantationsmedizin, Virchow-Klinikum, Berlin, D). Einen Überblick über die zur Analyse des endogen präsentierten MHC-Klasse-I-Peptidrepertoires auf gesunden Zellen eingesetzten Milzgewebeproben gibt Tabelle 2.

Tabelle 2: Übersicht über Milzgewebeproben für die MHC-Klasse-I-Peptidanalyse:

Milz	Gewebemenge	HLA-Genotyp des Spenders	
1	10 g	HLA-A1 HLA-A2	HLA-B12 HLA-B17
2	25 g	HLA-A2 HLA-A3	HLA-B5 HLA-B35
3	50 g	HLA-A1 HLA-A3	HLA-B8 HLA-B35
4	9,6 g	HLA-A3 HLA-A9	HLA-B7 HLA-B13

2.12 Puffer und Lösungen

Alle nicht weiter aufgeführten Puffer wurden nach Standardprotokollen angesetzt (130). Puffer und Lösungen ohne spezielle Angaben wurden bei Raumtemperatur gelagert.

MOPS (10x) pH 7,0

0,2	M	MOPS
50	mM	Na-Acetat
10	mM	EDTA

Der Puffer wurde im Dunkeln bei 4°C gelagert.

SSC (20x)

3	M	NaCl
0,3	M	Trinatriumcitrat

Der Puffer wurde mit 10N NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert.

PBS (10x)

1,47	mM	KH ₂ PO ₄ x H ₂ O
8,1	mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
2,7	mM	KCl
137	mM	NaCl

Der Puffer wurde mit HCl auf pH 7,4 eingestellt, durch einen Filter mit 0,2 µm Porengröße steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Milzgewebe-Puffer

1	x	PBS
2	mM	EDTA, pH 8

Der Puffer wurde durch einen Filter mit 0,2 µm Porengröße steril filtriert und bei 4°C gelagert.

MACS-Puffer

1	x	PBS
2	mM	EDTA, pH 8
5	%	BSA

Der Puffer durch einen Filter mit 0,2 µm Porengröße steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Elutionspuffer

0,1	M	Glycin
0,1	M	NaCl

Der Puffer wurde mit HCL auf pH 3,2 eingestellt, durch einen Filter mit 0,2 µm Porengröße steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Protein-Probenpuffer (4x)

500	mM	Tris-HCl, pH 6,8
8	%	SDS
20	%	β-Mercaptoethanol
40	%	Glycerin (87%)
0,2	%	Bromphenolblau

Der Puffer wurde bei -20°C gelagert.

Proteasom-Lysepuffer

30	mM	Tris-HCl, pH 7,8
1,6	mM	DTT
0,1	mM	EDTA
2	mM	MgCl ₂
0,1	%	Triton X-100

Der Lysepuffer wurde vor der Präparation immer frisch angesetzt.

TSDG_{Index}

10	mM	Tris-HCl, pH 7,8
1	mM	DTT
0,1	mM	EDTA
2	mM	MgCl ₂
10	mM	NaCl
10	% (w/v)	Glycerin
***	mM	KCl, pH 7,4

***Unterschiedliche Konzentration von KCl wurden wie im Index angegeben zugesetzt (z.B. TSDG₂₅ ≈ 25mM KCl). Der Puffer wurde bei -20°C gelagert.

15-35% Glycerin-Gradient15% Glycerin-Lösung

10	mM	Tris-HCl, pH 7,8
1	mM	DTT
0,1	mM	EDTA
2	mM	MgCl ₂
100	mM	NaCl
10	mM	KCl
15	%	Glycerin

Die Lösung wurde mit HCl auf pH 7,4 auf Eis eingestellt.

35% Glycerin-Lösung

10	mM	Tris-HCl, pH 7,8
1	mM	DTT
0,1	mM	EDTA
2	mM	MgCl ₂
100	mM	NaCl
10	mM	KCl
35	%	Glycerin

Die Lösung wurde mit HCl auf pH 7,4 auf Eis eingestellt.

Proteasom-Probenpuffer (10x)

(wird als 10 x Puffer eingesetzt)

0,5 mM	DTT
30 mM	Tris-HCl, pH 7,6
10 mM	KCl
2 mM	MgCl ₂

Der Puffer wurde bei 4°C gelagert.

MHC-Lysepuffer (2x)

1 x	PBS
0,6 %	CHAPS
je 100 ml 3 Tabl.	Proteaseinhibitor <i>complete</i>
2 mM	MgCl ₂

Der Puffer wurde immer frisch angesetzt.

Citratpuffer

50 mM	Citronensäure
0,02 mM	Natriumazid

Der Puffer wurde mit NaOH auf pH 3,0 eingestellt und bei 4°C gelagert.