

---

## 3 Methoden

### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Alle verwendeten Zellen wurden in RPMI 1640 Medium im Inkubator bei 5% CO<sub>2</sub>, 37°C und 95% feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre kultiviert. Grundsätzlich wurde das RPMI 1640 Medium mit folgenden Medienzusätzen komplettiert: 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Pyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Für die humanen Zelllinien K562 und T2 sowie allen Hybridom-Zelllinien diente dies als Nährmedium. Für die Kultivierung der Transfektanten KB8.15 und KA3.2 wurde dem Kulturmedium 1 mg/ml G418 beigefügt. Die Anzucht der Brustepithel-Zelllinie T47D erfolgte in RPMI 1640/ $\beta$ -Estradiol (5,48 ng/ml). Alle Suspensionszellen wurden bei einer Ausgangszelldichte von  $1-5 \times 10^5$  Zellen pro ml ausgesät und alle 2-3 Tage 1:3– 1:5 gesplittet.

#### 3.1.2 *Large scale*-Kultivierung in Rollerflaschen

Um größere Zellmengen zu kultivieren, wurden  $10^7$  Suspensionszellen aus einer Vorkultur in 2 l-Rollerflaschen überführt und in einem Liter Zellkulturmedium aufgenommen. Die Flaschen wurden auf einem Rollergestell bei 2 U/min im Inkubator gedreht. Die Ernte der Zellen erfolgte bei beginnender Acidifizierung des Mediums. Hierfür wurde die Zellsuspension unsteril in 400 ml Zentrifugenbecher überführt und in einer Beckmann Zentrifuge (Rotor JA-10.500) bei 2 100 rpm und 4°C 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen im Niederschlag wurden in 370 ml eiskaltem 1 x PBS gewaschen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

#### 3.1.3 Anzucht von Hybridomzellen im Minifermenter

Alle Hybridomzellen wurden in T-Flaschen bis zu einer Zellzahl von  $0,5-1 \times 10^8$  angezogen. Die Zellen wurden bei 1 200 rpm in einer Untertischzentrifuge sedimentiert und der Niederschlag in 40 ml RPMI 1640 Medium (einschließlich Zusätzen) resuspendiert. Um die schädigende Wirkung von Scherkräften zu reduzieren, wurden 0,1% *cell-PROTECT* zugesetzt. Die Zellen wurden anschließend steril in das Produktionsmodul (miniPERM classic/12,5 kDa) eines Minifermenters überführt, das Versorgungsmodul mit frischem

Medium (RPMI 1640; 450 ml) befüllt und der Fermenter auf einer Drehvorrichtung bei 2 U/min, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchte und 37°C in einem Inkubator kultiviert. Mit steigender Zelldichte und bei guter Zellvitalität wurde die Drehgeschwindigkeit einige Tage nach Start der Minifermenterkultur auf bis zu 5 U/min erhöht. Ein kompletter Medienwechsel im Versorgungsmodul erfolgte bei beginnender Acidifizierung. Die erste Ernte wurde 2-3 Wochen nach Kulturstart, anschließend einmal wöchentlich durchgeführt. Hierfür wurden dem Produktionsmodul 20-25 ml Zellsuspension steril entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Der entnommene Hybridomüberstand wurde bei 4 000 rpm für 10 min und 4°C zentrifugiert. Das Zellniederschlag wurde verworfen und der Überstand durch einen Filter mit 0,45 µm Porenweite steril filtriert. Die im Überstand enthaltenen Antikörper wurden über eine Protein-A-Sepharosesäule gereinigt und gegen 1 x PBS dialysiert (3.3.1). Erfolgte die Reinigung nicht sofort, wurde der Hybridomüberstand bei -20°C gelagert.

### **3.1.4 Cryokonservierung von Zellen**

Zur Cryokonservierung wurden  $0,5-1 \times 10^7$  Zellen in 1-1,5 ml Einfriermedium (10% DMSO/ 90% FCS) resuspendiert und in ein Cryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden für 15 min auf Eis gekühlt, für 1-3 Tage bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **3.1.5 Auftauen von Zellen**

Cryokonservierte Zellen in tiefgefrorenen Ampullen wurden in einem 37°C Wasserbad angetaut, in 50 ml 1 x PBS resuspendiert und anschließend durch Zentrifugation für 5 min bei 1 200 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und der Zellniederschlag in 15 ml Zellkulturmedium aufgenommen.

### **3.1.6 Bestimmung der Lebendzellzahl**

Zur Ermittlung der Zellzahl ist es nötig, zwischen lebenden und abgestorbenen Zellen zu unterscheiden. Hierfür wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Zellen, die blau angefärbt waren, wurden bei der Zählung nicht berücksichtigt; sie waren nicht mehr vital. Die Lebendzellzahl/ml wurde

anschließend wie folgt berechnet: Anzahl ungefärbter Zellen in 16 Quadraten x Verdünnungsfaktor x  $10^4$ .

### 3.1.7 Isolierung von PBMCs aus humanem *Buffy-Coat*-Blut und Leukapherisaten

Zur Isolierung von PBMCs wurden 20 ml Leukaphereseprodukt oder Vollblut (1:3 Verdünnung mit PBS) über 30 ml Ficoll ( $\rho = 1,077$  g/ml) geschichtet und zur Phasenauf-trennung für 30 min bei RT und 2 000 rpm in einer Untertischzentrifuge zentrifugiert (Bremse ausgeschaltet). Lymphozyten, Monocyten und - bei Leukaphereseprodukten stark ange-reicherte Granulozyten - wurden der Interphase entnommen und 2 x mit PBS gewaschen. Nach dem ersten Waschschrift wurde für 10 min bei 1 400 rpm und RT - das zweite Mal bei 700 rpm - zentrifugiert. Gegebenenfalls wurden noch vorhandene Erythrozyten durch Lyse entfernt. Hierfür wurde der Zellniederschlag 20 sec in 5 ml Wasser inkubiert, auf 50 ml mit 10 x PBS aufgefüllt und anschließend durch Zentrifugation bei 1 200 rpm in einer Untertischzentrifuge sedimentiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis ein klarer Zellniederschlag erhalten wurde. Je nach Versuchszweck wurden die Zellen entweder als Niederschlag bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert, cryokonserviert oder als Zellkultur weitergeführt.

### 3.1.8 Isolierung von humanen Milzzellen

Zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus humanem Milzgewebe wurden 3 g Frischgewebe entnommen, in eine sterile Petrischale überführt und mit 10 ml Milzgewebe-Puffer (2.12) bedeckt. Das Gewebestück wurde mit einem Stößel zerkleinert und zur weiteren Homogenisierung mehrfach durch eine Kanüle passagiert. Zur Abtrennung von Kollagenfasern und kleineren Gewebepartikeln wurde das Homogenat durch ein  $100\ \mu\text{m}$  Zellsieb gefiltert. Der Durchlauf wurde in 50 ml Falcon-Gefäßen gesammelt, auf 50 ml mit Milzgewebe-Puffer aufgefüllt und bei RT für 10 min bei 450 g zentrifugiert. Der Zellniederschlag wurde in 50 ml Milzgewebe-Puffer resuspendiert und anschließend über ein Ficollkissen geschichtet und zentrifugiert (siehe 3.1.7). Die isolierten Monocyten und Lymphozyten wurden cryokonserviert und in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 3.1.9 Elektroporation von humanen Zellen

Die humane Zelllinie K562 wurde, wie unter 3.1.1 beschrieben, bis zur log-Phase kultiviert. Anschließend wurden  $4,5 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz unter sterilen Bedingungen für eine Elektroporation vorbereitet.

Die Zellen wurden 2 x mit PBS (ohne Calcium und Magnesium) gewaschen und je Ansatz in 500  $\mu$ l RPMI-Medium ohne Zusätze aufgenommen. Nach Transfer in eine Elektroporationsküvette (Schichtdicke 0,4 cm) wurden 16  $\mu$ g der zu integrierenden DNA (pCDNA3/HLA-B8 bzw. pCDNA3/HLA-A3) dem Ansatz beigefügt und vorsichtig mit den Zellen durchmischt. Nach Inkubation für 10 min auf Eis wurden die Küvetten in ein Elektroporationsgerät (GenePulser) überführt. Es erfolgte ein Impuls bei 960  $\mu$ F und 200 V. Zur Regeneration der Zellen wurden die Ansätze 10 min auf Eis inkubiert und danach in 13 ml Zellkulturmedium unter Zusatz eines geeigneten Selektionsreagenzes (1mg/ml G418) überführt.

### 3.1.10 Subklonierung von K562-Transfektanten

Um nach Transfektion von K562-Zellen mit HMC-kodierenden cDNAs einen positiven Klon zu selektionieren, wurde eine Subklonierung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen auf eine Dichte von einer Zelle/ml Kulturmedium eingestellt und in einer 96-Loch-Flachbodenplatte ausgesät. In jedes Loch wurden 100  $\mu$ l der verdünnten Zellsuspension pipettiert, so dass statistisch in jedem 10-ten Loch eine Zelle vorhanden war. Die 96-Loch-Platten wurden für 2-3 Wochen im Brutschrank kultiviert und die herangewachsenen Klone in eine 24-Loch Platte transferiert und expandiert. Die Zellen wurden immer in Selektionsmedium mit 1 mg/ml G418 kultiviert. Die einzelnen Klone wurden anschließend auf MHC-Klasse-I-Expression mittels Durchflusszytometrie untersucht (3.1.11).

### 3.1.11 Analyse oberflächengefärbter Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Analyse diente dem immunchemischen Nachweis von zellulären Oberflächenmolekülen. Bei dieser Methode werden Oberflächenmoleküle von Zellen immunchemisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Fluoreszenz der markierten Zellen wird anschließend in einem Durchflusszytometer gemessen. Dabei wird die Fluoreszenzemission und Lichtstreuung registriert und daraus die Größe und Gestalt der

Zelle errechnet. Da einzelne Zellen detektiert werden, können Zellpopulationen semiquantitativ erfasst werden.

Diese Methode wurde in erster Linie zum semiquantitativen Nachweis von MHC-Klasse-I-Komplexen auf humanen Zellen eingesetzt und erfolgte unter anderem bei jeder Ernte von HLA-A3- und HLA-B8-transfizierten K562-Zellen. Es wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in 50  $\mu$ l AKV (10% Venimun, 0,1%  $\text{NaN}_3$ , 1 x PBS) in einer 96-Loch-Kulturplatte für 10 min zur Blockierung der FC-Rezeptoren bei 4°C inkubiert. Die für das Oberflächenmolekül spezifischen Antikörper (2  $\mu$ g/Loch) wurden anschließend den Ansätzen zupipettiert. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz ungefärbter Zellen und eine entsprechende Isotypkontrolle mitgeführt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4°C wurden die Ansätze 3 x mit 1 x PBS (150  $\mu$ l/Loch) gewaschen (4°C, 1 200 rpm, 5 min). Die Zelniederschläge wurden in 50  $\mu$ l PBS resuspendiert. Bei Verwendung von unkonjugierten Antikörpern erfolgte dann der Zusatz von 5  $\mu$ l Anti-Maus IgG + IgM-FITC Detektionsantikörper. Hierfür wurden die Ansätze weitere 30 min bei 4°C inkubiert, die Zellen gewaschen und in PBS resuspendiert. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die resuspendierten Zellen in FACS-Röhrchen überführt und das Volumen auf 300  $\mu$ l PBS aufgefüllt. Die Analyse erfolgte mit einem *FACS Calibur* Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson.

### **3.1.12 Magnetisches Sortieren von Zellen (MACS)**

Nach Transfektion von K562-Zellen mit MHC-Klasse-I-kodierenden cDNAs wurde zur Anreicherung von Zellen, welche MHC-Klasse-I exprimierten, die nicht transfizierte Population durch magnetische Trennung isoliert. Hierfür wurden  $1-5 \times 10^6$  Zellen in RPMI 1640 Medium ohne Zusätze gewaschen und in 50  $\mu$ l 1 x PBS mit je 2% Anti-humanen CD16-, CD32- und CD64-Antikörpern für 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 4°C mit 2  $\mu$ g des HLA-A3 spezifischen Antikörpers GAP-A3 oder des pan-HLA-Klasse-I-spezifischen Antikörpers W6/32 inkubiert. Die Zellen wurden 2 x mit 3 ml MACS-Puffer (2.12) gewaschen und in 80  $\mu$ l MACS-Puffer resuspendiert. Jedem Ansatz wurden 20  $\mu$ l Ratte Anti-Maus IgG2a+b *MicroBeads* zugesetzt. Nach Inkubation bei 6-12°C für 15 min wurden die Zellen 2 x mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen und der Zelniederschlag in 500  $\mu$ l MACS-Puffer resuspendiert. Die Separationssäule (*MIDI-MACS MS/RS-Säule*) wurde in das magnetische Feld einer *MACS*-Apparatur (*Octo-MACS*) platziert, mit drei Säulenvolumina MACS-Puffer äquilibriert und die vorbereiteten Zellen auf die Säule appliziert. Zum Ausspülen nicht gebundener Zellen wurde die Säule mit adäquater Menge MACS-Puffer gewaschen. Zur Elution der gebundenen Zellen wurde die Säule dem *MACS*-Magneten entnommen, auf ein steriles Sammelgefäß platziert und nach Zugabe von 2-3 ml

MACS-Puffer von der Säule eluiert. Das Eluat wurde in 50 ml MACS-Puffer gewaschen, bei 1 200 rpm (Untertischzentrifuge) zentrifugiert und der sedimentierte Zellschlag anschließend in Selektionsmedium kultiviert.

### 3.1.13 Test auf MHC-Stabilisierung

Die Testung der Bindungsfähigkeit und -spezifität potentieller HLA-A2-restringierter Nonamer-Peptide der Proteine LMO4 und Lyl1 erfolgte mit der Zelllinie 174 x MCM (T2). Diese Zelllinie ist TAP-Transporter defizient, wodurch keine zytosolisch prozessierten Peptide zur Beladung leerer MHC-Klasse-I-Moleküle im ER zur Verfügung stehen. Dies bedingt, dass eine Stabilisierung von leichter und schwerer Kette des MHC durch einen Peptidliganden ausbleibt und somit nur noch wenige, leere MHC-Moleküle an der Zelloberfläche für kurze Zeit exponiert werden. Diese Eigenschaft wurde zur Testung der Bindungsfähigkeit und -spezifität von synthetischen Nonamer-Peptiden ausgenutzt. Dabei reflektiert die Menge der durch exogene Peptidzugabe stabilisierten MHC-Klasse-I-Moleküle an der Zelloberfläche die Bindungsfähigkeit des jeweiligen Testpeptids.

Die Vorhersage potentieller HLA-A2 Liganden, abgeleitet aus der Aminosäuresequenz der Proteine Lyl1 und LMO4, erfolgte unter Verwendung der Programme SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de>) und BIMAS ([http://bimas.cit.nih.gov/molbio/hla\\_bind](http://bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind)). Eine Auswahl von 9 bzw. 10 Peptiden, die bei der Epitopvorhersage am besten bewertet worden waren, wurden für den MHC-Stabilisierungstest synthetisch hergestellt. Sie sind in Tabelle 3 aufgelistet.

**Tabelle 3: Potentielle HLA-A2 bindende Peptidliganden aus LMO4 und Lyl1:**

Peptid	Sequenz	Peptid	Sequenz
LMO4-56	QLGDIGTSC	LYL1-79	TLGTAPPTL
LMO4-145	LINGHLNSL	LYL1-191	RLLRDQAAA
LMO4-123	VPGDRFHYI	LYL1-178	VLRLAMKYI
LMO4-79	RLFGNSGAC	LYL1-69	TLRPPLLQL
LMO4-30	IADRFLLYA	LYL1-81	GTAPPTLAL
LMO4-70	MILCRNDYI	LYL1-182	AMKYIGFLV
LMO4-106	NVQHLKCFT	LYL1-59	GVAMPTTEL
LMO4-102	RAQGNVYHL	LYL1-42	RLLPPGVPVI
LMO4-99	LVMRAQGNV	LYL1-185	YIGFLVRL
LMO4-34	FLLYAMDSY		

Für den MHC-Stabilisierungsversuch wurden T2-Zellen in serumfreien Medium gewaschen und anschließend in serumfreien Medium resuspendiert. Nach Inkubation über Nacht für ca. 18 h im Brutschrank bei 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchte und 37°C wurden die Zellen auf eine Dichte von 10<sup>6</sup> Zellen pro ml in serumfreien Medium eingestellt. Für jedes Testpeptid wurden je 3 Ansätze mit unterschiedlichen Peptidkonzentrationen (1, 10 und 100 µg/ml) in 24-Lochplatten vorbereitet. Jedem Ansatz wurden 10 µg/ml β2-Mikroglobulin beigefügt. Die Kulturplatten wurden 3 h im Brutschrank bei 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchte und 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Stabilisierung der MHC-Klasse-I-Moleküle mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung einer HLA-A2-FITC markierten Antikörperlösung getestet.

### **3.1.14 Acridinorange-Färbung von K562-Zellen unter dem Einfluß von STI 571**

Zur Analyse der Wirkweise von STI 571 auf K562-Zellen wurden K562-Zellen in einer Sechsllochplatte bei einer Dichte von 4 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Loch ausgesät. STI 571 wurde vor Versuchsbeginn steril in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gelöst, um eine 2 mM Lösung herzustellen und anschließend in einer finalen Konzentration von 0,25 µM, 0,5 µM bzw. 1 µM den Zellen zugesetzt. Ein Kontrollansatz mit unbehandelten K562-Zellen wurde zeitgleich im Brutschrank angezogen. Nach 4, 12, 18, 24, 42, 50 oder 66 h wurde der Einfluß des Tyrosinkinase-Inhibitors durch eine Acridinorange-Färbung untersucht. Acridinorange (3,6-Bis-(dimethyl-amino)-Acridin) ist ein Farbstoff, der unspezifisch in DNA-Moleküle interkaliert. Diese Färbung kann unter UV-Licht visualisiert werden und diente der Quantifizierung apoptotischer Zellen, die durch ihre charakteristische Kernfragmentierung von nicht-apoptotischen Zellen unterschieden wurden. Hierfür wurden 15 µl Zellsuspension entnommen, mit 1 µl (10 µg/ml) Acridinorange auf einem Objektträger angefärbt und innerhalb einer Auswahl von 100 Zellen die Anzahl der apoptotischen Zellen unter einem UV-Mikroskop ermittelt.

## **3.2 Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1 DNA Standardmethoden**

Alle Standardmethoden wie Isolation von Plasmid DNA aus *E.coli*, gelelektrophoretische Trennungen, DNA-Restriktionsanalysen, DNA Elution aus Agarosegelen u.s.w. wurden nach Sambrook et al. (130) bzw. dem jeweiligen Protokoll des Herstellers durchgeführt. Alle für diese Arbeit relevanten, modifizierten Methoden werden hier aufgeführt.

### 3.2.2 cDNA Synthese

Durch Reverse Transkription wurde mRNA aus K562-Zellen oder HLA-B8-positiven T-Zellen in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde der cDNA-Synthese Kit von Boehringer/Mannheim verwendet und exakt nach Herstellerangaben gearbeitet. Zur Kontrolle der cDNA-Qualität wurde humanes  $\beta$ 2-Mikroglobulin mittels PCR amplifiziert. Die erhaltene T-Zell-cDNA wurde anschließend zur Amplifikation des HLA-B8-Gens eingesetzt. Die cDNA aus K562-Zellen diente zur Herstellung einer LMO4-spezifischen Sonde.

### 3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten. Sie basiert auf drei, sich mehrfach wiederholenden Zyklen der DNA-Denaturierung, Hybridisierung mit sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primern und anschließender DNA-Synthese, wobei der zwischen den Primern liegende Bereich amplifiziert wird. Die DNA-Synthese wurde durch die hitzestabile Tag-DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* ermöglicht. Dieses Enzym wurde zur Etablierung der PCR-Bedingungen verwendet. Anschließend wurde die PFU (*Pyrococcus furiosus*)-Polymerase mit *proofreading*-Funktion verwendet. Die PCR Reaktionen wurden in einem automatischen Thermocycler (PCR System Gene Amp 2400) der Firma Perkin Elmer durchgeführt.

Zur PCR-Amplifizierung von  $\beta$ 2-Mikroglobulin, HLA-B8 und LMO4 wurde folgender Reaktionsansatz hergestellt:

100	ng	cDNA
1	x	PCR Puffer
2,5	mM	MgCl <sub>2</sub>
2,5	mM	je Desoxynukleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
0,2	mM	je sense Oligonukleotid-Primer
0,2	mM	je antisense Oligonukleotid-Primer
2,5	U	Pfu- oder Tag-DNA-Polymerase
ad 50 $\mu$ l mit H <sub>2</sub> O		

Unmittelbar nach Enzymzugabe wurde folgendes PCR-Programm gestartet:

## Amplifizierung von HLA-B8

94°C	58°C	72°C	Zyklen
1 min 30 sec	1 min	2 min 30 sec	3
45 sec	45 sec	2 min 30 sec	37

## Amplifizierung von LMO4

94°C	68°C	72°C	Zyklen
1 min 30 sec	1 min	45 sec	1
25 sec	1 min	40 sec	40

Amplifizierung von  $\beta$ 2-Mikroglobulin

94°C	55°C	72°C	Zyklen
1 min 30 sec	1 min	45 sec	1
25 sec	30 sec	40 sec	26

Am Ende der PCR-Reaktion erfolgte ein Polymerisierungsschritt für 7 min bei 72°C. Danach wurden die Proben auf 4°C abgekühlt und für weitere Experimente auf einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Für ein analytisches Gel wurde 1/10 Volumen des Reaktionsansatzes aufgetragen, der restliche Ansatz für ein präparatives Gel verwendet. Die Elution der elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte unter Verwendung des *MinElute Gel Extraction Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben. Die amplifizierte DNA wurde über eine Sequenzanalyse (Invitak, Berlin, D) verifiziert.

### 3.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

(nach Brown et al. (131)).

Für die Expression von HLA-B8 bzw. HLA-A3 in K562-Zellen wurde PCR-amplifizierte cDNA in den Vektor pCDNA3 ligiert. Für den HLA-B8-Ligationsansatz wurde der Vektor mit dem Restriktionsenzym BamHI linearisiert und anschließend dephosphoryliert. Die Ligation von HLA-A3-kodierender cDNA (zur Verfügung gestellt von Dr. Pohla, GSF München, D) erfolgte nach Linearisierung der pCDNA3-Vektor-DNA mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NotI. Die Ligation der LMO4-DNA erfolgte direkt im Anschluss an die PCR-Amplifikation in den Vektor *pGEM-Teasy*. In allen Fällen wurde anschließend eine Hitzeschocktransformation in *E. Coli* durchgeführt.

### 3.2.5 Hitzeschocktransformation von *Escherichia coli*

Ein Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen XL1 *Blue* wurde auf Eis aufgetaut, 5 µl Ligationsansatz zugefügt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 50 sec einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und sofort auf Eis abgekühlt. Nach Erkalten des Ansatzes wurde 1 ml YT-Medium zugesetzt. Nach Inkubation für 30 min bei 37°C wurden 10 µl und 200 µl des Ansatzes auf Selektivmedien plattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C angezogen. Je Platte wurde eine Stichprobe von 10 Kolonien gepickt, in LB Medium über Nacht bei 37°C vermehrt und Plasmid-DNA präpariert. Die Integration der Fremd-DNA wurde anschließend über eine DNA-Restriktionsanalyse untersucht.

### 3.2.6 Gesamt-RNA Präparation

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Zellen und Zelllinien erfolgte unter Verwendung des *QIAGEN RNeasy Mini Kits* nach Herstellerangaben.

Zur Isolierung von RNA aus gefrorenen Leukapherese-Buffy-Coats oder humanen Milzgewebestücken wurde mit Trizol gearbeitet. Dabei wurde das gefrorene Material mit gleichem Volumenanteil (w/v) Trizol versetzt (oder bei bekannter Zellzahl mit 0,2 ml Trizol/10<sup>6</sup> Zellen). Der Zellaufschluss erfolgte bei 4°C unter Verwendung eines Ultrathurax. Anschließend wurden 0,2 ml Chloroform je 2 ml Homogenat zugesetzt. Die Emulsion wurde für 1 min durchmischt und 5 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation für 15 min bei 12 000 g und 4°C erfolgte eine Auftrennung des Ansatzes in drei Phasen. Die wässrige, oberste Phase wurde entnommen und mit saurem Phenol/Chloroform im Mischverhältnis 1:1 (v:v) versetzt. Der Ansatz wurde heftig durchmischt, 5 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C für 15 min bei 12 000 g zentrifugiert. Zur Fällung der RNA wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit gleichem Volumenanteil Isopropanol versetzen, durchmischt und bei -20°C 1 h inkubiert. Anschließend wurde die RNA durch Zentrifugation bei 12 000 g und 4°C sedimentiert. Es erfolgten zwei Waschschrte mit 70% EtOH (in DEPC-H<sub>2</sub>O). Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und der trockene Niederschlag in DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

### 3.2.7 Northern-Blot Analyse

Die Northern-Blot Analyse ermöglicht den Nachweis spezifischer RNA in einem heterogenen RNA-Gemisch. Hierfür wurde Gesamt-RNA aus humanen Zellen oder Geweben präpariert.

Von jeder Probe wurden 10 µg (gegebenenfalls auch 20 µg) auf einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit UV fixiert. Die Membranen wurden anschließend mit einer radiokativ markierten Sonde hybridisiert. Spezifische Signale wurden mittels Autoradiographie nachgewiesen.

### 3.2.7.1 RNA Agarose Gelelektrophorese

<u>RNA-Gel</u>	1,20 %	Agarose
	1,10 %	Formaldehyd
	1,10 x	MOPS, pH 7,0
<u>Premix</u>	1,3 x	MOPS, pH 7,0
	300 M	Formaldehyd
	400 %	Formamid
<u>Ladepuffer</u>	1 mM	EDTA
	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylen Cyanolblau
	50 %	Glycerin

Alle Proben wurden auf eine konstante Konzentration von 10 µg oder 20 µg RNA in 6 µl DEPC-Wasser eingestellt. Zu jeder dieser Proben wurden 19,5 µl denaturierender Premix, 5 µl Ladepuffer und 0,5 µl Ethidiumbromid (0,5 mg/ml) pipettiert. Die Proben wurden 15 min bei 55°C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und auf das Agarosegel geladen. Als Laufpuffer wurde 1 x MOPS-Puffer (2.12) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 V. Um einen gleichmäßigen Lauf zu erzielen, wurden die Geltaschen nach Einlaufen der Proben mit Laufpuffer gefüllt. Da die Ionenkapazität des Puffers sehr niedrig war, wurde der Puffer per Hand alle 30 min in der Gelkammer umgeschwänkt, um zu verhindern, dass sich ein Konzentrationsgefälle oder ein pH-Gradient innerhalb des Puffers bildet. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die aufgetrennten RNA-Banden unter UV-Licht visualisiert und für die spätere Größenbestimmung ein Zentimetermaß angelegt. Es waren dabei deutlich die 28 S, 18 S und 5 S rRNA als distinkte Banden zu erkennen. Anschließend wurde die RNA auf eine Nylonmembran transferiert (3.2.7.2).

### 3.2.7.2 Kapillartransfer von RNA

Der *Northern-Blot* Aufbau ist Abbildung 7 zu entnehmen. Der Transfer der RNA auf die Membran erfolgte mit 20 x SSC (2.12) durch Kapillarkräfte von unten nach oben über Nacht. Nach erfolgtem Transfer wurde die RNA durch *UV crosslinking* (Stratalinker) auf der Membran fixiert.

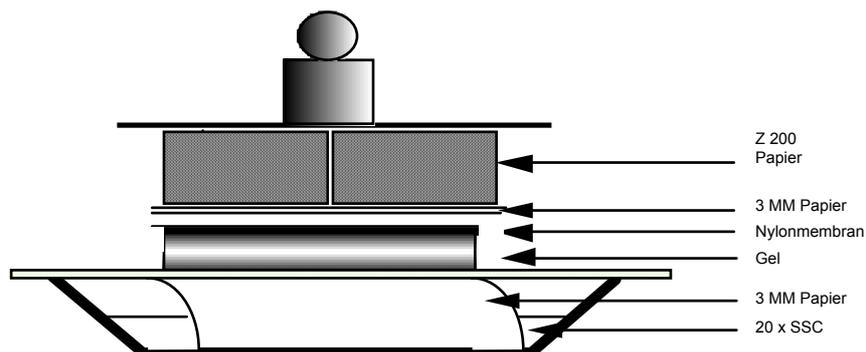


Abb. 7: Aufbau eines *Northern-Blots*.

### 3.2.7.3 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte in Anlehnung an die Methode von Feinberg und Vogelstein (132) und wurde unter Verwendung des *Labeling-Kit DecaPrime II<sup>TM</sup>* (Ambion) durchgeführt. Es wurden 20-100 ng DNA-Fragment in einem Gesamtvolumen von 10 µl Wasser mit 2,5 µl 10 x *Decamer Solution* denaturiert (5 min, 95°C), auf Eis abgekühlt und anschließend mit folgenden Komponenten aus dem *Labeling-Kit DecaPrime II<sup>TM</sup>* versetzt:

5 µl	Reaktionspuffer (ohne dCTP)
1 µl	exonukleasefreies Klenow-Fragment
5 µl	alfa- <sup>32</sup> P-dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)
1,5 µl	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

Nach Inkubation für 5-10 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA, pH 8, gestoppt. Nicht eingebaute, radioaktiv markierte Nukleotide wurden über eine Säule (*Sephadex spin colum*) abgetrennt. Die spezifische Aktivität dieser radioaktiv markierten DNA-Sonden lag zwischen 1-3 x 10<sup>9</sup> cpm/µg.

### 3.2.7.4 Hybridisierung

Um unspezifische Bindestellen der RNA Nylonmembran abzusättigen, wurde die mit DEPC-Wasser befeuchtete Membran 1 h bei 68°C in *ExpressHyb*-Hybridisierungslösung prähybridisiert. Die spezifische, radioaktiv markierte Sonde wurde in einer Konzentration von  $1-3 \times 10^6$  cpm/ml Hybridisierungslösung eingesetzt und über Nacht hybridisiert. Nach erfolgter Hybridisierung wurde die Membran gewaschen (Schritt 1-3) und die spezifischen Signale nach Autoradiographie detektiert.

Schritt	Waschlösung	Temperatur	Zeitraum
1. Schritt	2 x SSC; 0,1 % SDS	68°C	2 x 15 min
2. Schritt	0,5 x SSC; 0,1 % SDS	68°C	2 x 15 min
3. Schritt	0,1 x SSC; 0,1 % SDS	68°C	2 x 15 min

### 3.2.8 Affymetrix Oligonukleotid Array Technologie

*Microarrays* bestehen aus cDNAs oder Oligonukleotiden bekannter Sequenz, die auf Glas oder Silikon aufgedruckt oder synthetisiert werden. Sie ermöglichen, die Transkriptmenge von ca. 20 000 bis 40 000 verschiedenen Transkripten eines Genoms zu analysieren.

Für eine vergleichende Analyse der mRNA-Expression in Leukämiezellen von CML Patient BK1 versus Leukozyten gesunder Spender wurde der Oligonukleotid Array HG-U133A (Affymetrix, High Wycombe, UK) verwendet, bei dem Oligonukleotide direkt auf der Chipoberfläche synthetisiert werden. Jedes Gen auf diesem Array wird von bis zu 20 verschiedenen Oligonukleotiden repräsentiert, welche die gesamte Länge der kodierenden Region dieses Gens umspannen. Jedes dieser Oligonukleotide ist ein zweites mal auf dem Genchip repräsentiert, das mit einem *mismatch* Oligonukleotid gepaart ist, in dessen Sequenz die zentrale Base modifiziert ist. Die Kombination aus redundanten Proben und *mismatch* Kontrollsequenz gewährleistet, dass die Rate falsch positiver Ergebnisse minimal ist.

Für die Genexpressionsanalyse wurde Gesamt-RNA aus CML-Leukapheresezellen des Patienten BK1 und Leukozyten gesunder Spender (gepoolt von vier gesunden Probanden) präpariert und durch reverse Transkription in Doppelstrang cDNA umgeschrieben. Die Amplifizierung und Biotinylierung der cDNA-Probe (zu cRNA) erfolgte durch *in vitro* Transkription. Die Biotin-markierte cRNA Probe, hergestellt aus Test und Referenzprobe,

wurde auf zwei getrennten *Oligonucleotidarrays* hybridisiert und durch Bindung an Streptavidin konjugierte Fluoreszenzmarker angefärbt.

Die Detektion der gebundenen Probe erfolgte mittels Laseranregung des Fluoreszenzmarkers und dem *Scann* des resultierten Emissionsspektrums. Differenzen im Fluoreszenzsignal zwischen Probe und Referenzprobe reflektierten dabei Veränderungen im Expressionsprofil des analysierten Gens.

Die Durchführung dieses Experiments erfolgte in Kooperation mit Oliver Schoor (AG Prof. Rammensee, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, D) und wurde unter Verwendung der vom Hersteller (Affymetrix) empfohlenen Reagenzien und Arbeitsprotokolle durchgeführt.

### 3.3 Proteinchemische Methoden

#### 3.3.1 Reinigung monoklonaler Antikörper aus Hybridom-Überständen

Die Reinigung von Antikörpern aus Hybridom-Überständen erfolgte über eine Protein-A-Sepharose-CL-4B-Chromatographiesäule (Gelbett 1-1,5 ml). Hierfür wurde die Säule bei einer Flußrate von 2 ml/min mit 1 x PBS äquilibriert und der filtrierte Antikörperüberstand auf die Säule geladen (Flussrate von 0,5 ml/min). Nach einem Waschschrift von 1 h mit 1 x PBS wurden die gebundenen Antikörper mit 30 ml Elutionspuffer (2.12) über Gravitationskraft von der Säule eluiert. Die Elution der Antikörper wurde mittels *UV-Monitoring* bei 280 nm verfolgt und die *Peak*-Fraktion per Hand gesammelt. Das Eluat wurde anschließend gegen 1 x PBS dialysiert. Dialysierschläuche (Visking Dialysierschläuche Typ 20/32 N° 06531) wurden 10-15 min in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gekocht. Das Antikörpereluat wurde steril in einen vorbereiteten Dialysierschlauch überführt und 3 x gegen 1 x PBS dialysiert. Die Pufferwechsel erfolgten in Abständen von 30 min und 1 h. Anschließend wurde über Nacht dialysiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein *Bradford-Assay* durchgeführt und die Funktionalität der gereinigten Antikörper über eine durchflusszytometrische Analyse kontrolliert (3.1.11).

#### 3.3.2 Herstellung von Gesamtproteinrohextrakten

Zur Herstellung von Gesamtproteinrohextrakten wurden  $1 \times 10^8$  humane Zellen in 1 x PBS gewaschen, der Überstand verworfen und der Zellniederschlag in 1 ml 4 x Protein-Probenpuffer (2.12), versetzt mit 5%  $\beta$ -Merkaptoethanol, aufgenommen. Der Ansatz wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 10 min bei 70°C inkubiert. Die Homogenisierung des Ansatzes erfolgte über jeweils 10 Passagen durch eine 20G und 24G Kanüle. Der Ansatz wurde bei 13 000 g für 5 min zentrifugiert und der den

Gesamtproteinbestand der Zellen enthaltende Überstand in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

### 3.3.3 Protein-Gelelektrophorese (*SDS-PAGE*)

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde eine Gelelektrophorese (*SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE*) unter denaturierenden Bedingungen nach Lämmli (130) durchgeführt .

Je nach Größe des zu analysierenden Proteins wurde ein 7,5%, 10% oder 12% Trenngel verwendet. Die Proteinproben wurden vor Beladung des Gels mit 0,25 Volumina 4 x Protein-Probenpuffer (2.12) versetzt und 5 min auf 95°C erhitzt. Zur Identifizierung der Proteingrößen wurden 5-10 µl eines Molekulargewichtsstandards (*Benchmark* oder *Rainbow*<sup>TM</sup>-Marker) neben den Proteinproben geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 V. Die Proteine wurden anschließend durch Coomassie-Blau-Färbung (130) oder Silberfärbung (3.3.4) sichtbar gemacht. Für Western-Blot Analysen (3.3.5) wurden die Proteine durch Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

### 3.3.4 Silberfärbung

Zum Nachweis von Proteinmengen im Subnanogramm-Bereich wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Das Verfahren beruht auf einer Säurefixierung der Proteine im Gel und anschließender Inkubation mit Silbernitrat, wodurch einige Silber-Ionen von den Proteinen gebunden und durch Reduktion in Silberkeime umgewandelt werden. Es wurde nach dem Protokoll von Blum et al. (133) gearbeitet.

### 3.3.5 Western-Blot (Immunoblot)

Bei der Western-Blot-Methode werden Proteine nach *SDS-PAGE* auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der Proteintransfer wurde in einer *Semi-Dry*-Elektroblot-Kammer durchgeführt und erfolgte bei einer Stromstärke von 120 mA für Gele in der Dimension von 8 x 10 cm bei RT für 1 h. Nach Proteintransfer wurden alle unspezifischen Bindungsstellen der Membran mit 5% Milchpulver in 1 x TBS geblockt (1 h bei RT) und anschließend 3 x mit TBST für 5 min gewaschen. Der entsprechende Antikörper wurde 1:1000 in TBST verdünnt und die Membran darin 1 h bei RT geschwenkt. Nach erneutem Waschen (3 x mit TBST für je 5 min) wurde die Membran in einer 1:1000 Verdünnung eines biotinylierten Kaninchen-

oder Maus- Immunglobulins für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 x für je 5 min in TBST gewaschen. Die Färbung der Banden erfolgte unter Verwendung des ECL Western Blotting Kits.

### **3.3.6 Untersuchung der Proteasomschnittspezifität für BCR-ABL-Fusionsregionspeptide**

Für die Untersuchung der proteasomalen Degradation von BCR-ABL-Fusionsregionspeptiden wurde ein synthetisches 26mer Peptid (NVIVHSATGFKQSSKALQRPVASDFE, Reinheitsgrad >95%) hergestellt (WITA GmbH, Berlin, D) Dieses Peptid umspannt, flankiert von je 5 zusätzlichen C- und N-terminalen Aminosäuren, die gesamte BCR-ABL-Fusionsregion der b3a2 Proteinvariante.

Proteasomen wurden frisch aus lymphoblastoiden Zellen isoliert. Die Reinigung des konstitutiven Proteasoms (c20S) erfolgte aus der Zelllinie LCL721.174, welche aufgrund einer chromosomalen Deletion im MHC-Lokus LMP2 und LMP7 defizient ist (128; 134). Dabei führt der Verlust von LMP2 oder LMP7 zu einer ineffizienten Reifung der Proteasom-Untereinheit MECL1 (*Endopeptidase Complex-like 1*), so dass LCL721.174-Zellen nur aktive Untereinheiten des konstitutiven Proteasoms exprimieren (135). Immunoproteasomen (i20S) wurden aus der parentalen Zelllinie LCL721 isoliert.

Die Untersuchungen wurden im Labor von Prof. Rammensee in Kooperation mit Stefan Tenzer (AG Prof. Rammensee, Abteilung Dr. H.J. Schild, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, D) durchgeführt.

#### **3.3.6.1 Anzucht von LCL721 und LCL721.174**

LCL721- und LCL721.174-Zellen wurden unter Standardbedingungen in Rollerflaschen angezogen, bis ein Zellniederschlag im Volumen von ca. 30-40 ml zur Verfügung stand. Die Zellniederschläge wurden durch Abzentrifugieren der Kulturen geerntet und die Zellen sofort in eiskaltem 1 x PBS gewaschen. Proteasomen können auch aus gefrorenen Zellniederschlägen präpariert werden, so dass eine Lagerung der Zellen bei -80°C bis zur Aufarbeitung möglich war.

### 3.3.6.2 Präparation von 20S Proteasomen

Die Reinigung der Proteasomen erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Groettrup et al. (87). LCL721- und LCL721.174-Zellen wurden jeweils mit gleichem Volumenanteil Proteasom-Lysepuffer (2.12) versetzt, in einem Dounce-Homogenisator homogenisiert, 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend 4 x durch eine 23G und 21G Kanüle passagiert. Nach Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 15 000 rpm (Rotor SS34) befanden sich die zytosolischen Proteine im Überstand. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt, durch Zugabe von NaCl auf eine Endkonzentration von 300 mM eingestellt und über eine TSDG<sub>300</sub> (2.12) präequilibrierte DEAE Matrix (DE-52-Cellulose *analytical grade*) gereinigt. Zur Elution wurden 100 ml TSDG<sub>300</sub> eingesetzt.

Die Proteine des Eluats wurden zunächst mit 30% Ammoniumsulfat gefällt, indem 242 mg/ml (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nach und nach zugefügt wurden. Der Ansatz wurde langsam bei 4°C für 3-4 h gerührt und anschließend bei 15 000 rpm 30 min zentrifugiert (Rotor SS-34). Der die Proteasomen enthaltende Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt und einer Ammoniumsulfat-Fällung von 30-70% unterzogen, indem 230 mg/ml (bezogen auf das Volumen der ersten Fällung) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> beigefügt wurden. Der Ansatz wurde erneut für 3-4 h bei 4°C langsam gerührt. Durch Zentrifugation bei 15 000 rpm für 30 min wurden die Proteasomen sedimentiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde in 50 ml TSDG<sub>0</sub> gelöst und anschließend über Nacht gegen TSDG<sub>25</sub> dialysiert.

Zur weiteren Anreicherung der gefällten Proteasomen wurde eine Anionen-Austausch-Chromatographie durchgeführt. Eine DEAE-Anionen-Austausch-FPLC wurde mit einer Flußrate von 2 ml/min und einer Fraktionsgröße von 8 ml durchgeführt (Säule: TSK 650S Toyopearls, DEAE, 100 ml Gelvolumen). Die Probe wurde manuell geladen. Die Auftrennung erfolgte nach folgendem Schema (Puffer A:TSDG 0; Puffer B:TSDG 1000):

Schritt		Puffer	Volumen
1	8%	Puffer B	300 ml
2	8-25%	Puffer B	400 ml
3	36%	Puffer B	150 ml
4	40%	Puffer B	150 ml

Beginnend von Schritt 2 bis zur Hälfte von Schritt 4 wurden Fraktionen zu je 8 ml gesammelt. Anschließend wurde die Säule mit einer Flussrate von 2 ml/min wie folgt gewaschen:

Schritt		Puffer	Volumen
1	1 M	NaCl 10mM TrisCl pH 7,6	500 ml
2	10 mM	TrisCl pH 7,6	300 ml
3	20 %	Ethanol	200 ml

### 3.3.6.3 Kontrolle der proteolytischen Aktivität gereinigter Proteasomen

Alle Fraktionen (aus 3.3.6.2) wurden auf proteolytische Aktivität getestet. Als Substrat diente das fluorogene Peptidderivat suc-LLVY-AMC (Succinyl-Leucyl-Leucyl-Valyl-Tyrosyl-7-Amino-4-Methylkumarin). Jeder zu testenden Fraktion wurden 20 µl Probe entnommen und mit 180 µl Substratmix (100 µM suc-LLVY-AMC in 10 x Proteasom-Probenpuffer) versetzt. Nach Inkubation für 0-6 h wurde die Fluoreszenz in einem Tecan Spektrophotometer bei einer Anregung von 360 nm und einer Emission von 450 nm gemessen. Fraktionen mit mindestens halbmaximaler Aktivität wurden vereint und mittels Größenausschlusszentrifugation über eine Biomax-50 Membran aufkonzentriert.

Um den Reinheitsgrad der gereinigten Proteasomen weiter zu erhöhen, wurden die eingeeengten Proben auf einen 15-35% Glycerin-Gradienten (2.12) geschichtet. Je Probenröhrchen wurde 1 ml Proteinlösung geladen. Nach Zentrifugation für 18 h bei 30 000 rpm und 4°C wurde in das untere Ende der Probenröhrchen eine Öffnung eingeführt und jeder Probe 20-25 Fraktionen zu je 600 µl entnommen. Jeder Fraktion wurden je 10 µl Probe entnommen, mit 90 µl Substratmix gemischt, für 30 min bei 37°C inkubiert und erneut auf proteolytische Aktivität getestet. Die Proteasomen enthaltenden Fraktionen wurden vereint und nach Bestimmung der Proteinkonzentration (mittels Bradford-Assay) auf 1 mg/ml eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### 3.3.6.4 *In vitro* Proteasomspaltung eines synthetischen BCR-ABL 26mer Peptids

In jeweils getrennten Ansätzen wurden 10 nmol synthetisches Peptid (BCR-ABL 26mer) mit 2 µg Proteasom (c20S oder i20S) in 10 x Verdaupuffer (200 mM HEPES-NaOH pH7,6, 20 mM MgCl<sub>2</sub>) bei 37°C inkubiert. Die Dauer der Inkubation variierte je nach Versuchsansatz zwischen 3 und 18 h. Die Reaktion wurde durch Einfrieren bei -80°C gestoppt.

### 3.3.6.5 Chromatographische Auftrennung von Proteasomspaltprodukten

Die chromatographische Auftrennung der Proteasomspaltprodukte erfolgte auf einer RP-C2/C18-Säule ( $\mu$ RP-SC2.1/10; Säulendimension: 2.1 x 100 mm; Amersham Pharmacia, Freiburg, D) einer Microbore-HPLC-Anlage (SMART-System). Es wurde folgender TFA/ACN-Gradient (Eluent A: 0,1% TFA; Eluent B: 0,081% TFA in 80% ACN) bei einer Flußrate von 150  $\mu$ l/min gefahren:

Minute	% Eluent B
0- 15	0 %
15- 75	0- 60 %
75- 95	60-100 %
95-105	100 %

Die UV-Detektion erfolgte bei 214 nm. Fraktionen wurden bis zu einem Maximalvolumen von 500  $\mu$ l/*peak* gesammelt.

### 3.3.6.6 Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI/MS)

Dieses Verfahren ermöglicht die Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Dabei werden Peptide mit einer Matrix ( $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymizsäure, 10 mg/ml) in 50% Acetonitril und 0,1% TFA auf einem Probenhalter kokristallisiert, mit einem Laser ionisiert und in einem Massenanalysator gemäß ihres Masse/Ladungs-Quotienten aufgetrennt und detektiert. Dieses Verfahren wurde zur Analyse der chromatographisch aufgetrennten Proteasomspaltprodukte angewandt.

### 3.3.6.7 Edman-Abbau

Die Identifizierung und Quantifizierung der chromatographisch aufgetrennten Proteasomspaltprodukte erfolgte durch Edman-Abbau in einem *pulsed-liquid* Procise 494 (Applied Biosystems, Weiterstadt, D) und wurde durch Herrn Dr. Stefan Stevanovic (AG Prof. Rammensee, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, D) durchgeführt.

### 3.3.7 Isolierung und Analyse von MHC-Klasse-I-Peptiden

modifiziert nach (136)

Alle für die Reinigung erforderlichen Lösungen wurden mit HPLC-*grade* Wasser angesetzt, alle Reagenzien hatten den höchsten chemischen Reinheitsgrad und alle verwendeten Gefäße waren einige Tage mit 0,1% TFA vorgespült worden. Alle Arbeitsschritte von 3.3.7.1-3.3.7.3 erfolgten bei 4°C.

#### 3.3.7.1 Isolierung von MHC-Klasse-I-Molekülen aus humanen Zellen

Gefrorene Zellniederschläge ( $10^{10}$ - $10^{11}$  Zellen) oder zerkleinerte Gewebestücke aus humanen Milzen wurden zu gleichen Volumenanteilen mit 2 x MHC-Lysepuffer (2.12) versetzt, mit einem Ultrathurax homogenisiert und anschließend unter stetigem Rühren aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden mit 1 Volumen 1 x MHC-Lysepuffer (bezogen auf das Ausgangsvolumen) verdünnt, 1 h unter stetigem Rühren lysiert und mit einem Dounce-Homogenisator homogenisiert. Zur vollständigen Zelllyse wurde der Ansatz eine weitere Stunde gerührt. Es folgte eine Vorreinigung des Lysats durch Zentrifugation bei 4 000 rpm für 20 min, der eine Ultrazentrifugation (Beckman Ultrazentrifuge, Rotor Ti45) für 1 h bei 40 000 rpm angeschlossen wurde. Der klare Überstand wurde entnommen und durch einen 0,2 µm-Filter (Sartolab Plus) filtriert. Aus dem geklärten Lysat erfolgte die Immunpräzipitation der MHC-Klasse-I-Moleküle.

#### 3.3.7.2 Immunpräzipitation von MHC-Klasse-I-Molekülen

Vorgereinigtes Zelllysate wurde mit 20-30 mg pan-HLA-Klasse-I-spezifischen Antikörper W6/32 oder einem Anti-humanen HLA-A3-Antikörper (GAP-A3) versetzt und 1 h bei 4°C inkubiert. Eine Protein-A-Sepharosesäule (1-1,5 ml Gelbett) wurde mit 30 Säulenvolumina 1 x MHC-Lysepuffer equilibriert. Der Präzipitationsansatz wurde bei einer Flußrate von 1 ml/min mindestens 2 x linear oder zyklisch über Nacht appliziert. Anschließend wurde die Säule je 1 h mit 1 x PBS gespült, gefolgt von einem zweiten Waschschrift mit H<sub>2</sub>O (Flußrate 1 ml/min). Die Elution der gebundenen MHC-Komplexe erfolgte mit Citratpuffer (2.12) bei pH 3 in 2 Fraktionen (F) zu 4 ml (F1) und 3 ml (F2).

### 3.3.7.3 Peptidextraktion aus gereinigten MHC-Klasse-I-Molekülen

Zur vollständigen Peptidextraktion aus gereinigten MHC-Klasse-I-Komplexen wurden die MHC-Eluate aus 3.3.7.2 mit 0,25% TFA versetzt. Eine Centricon-10 Filtereinheit (Ausschlussgrenze: 10 kDa) wurde mit Citratpuffer/0,25% TFA vorgespült. Die MHC/Peptidextrakte wurden auf die vorgespülte Filtereinheit geladen und zur Abtrennung der Peptide von hochmolekularen Proteinanteilen über Nacht bei 4 000 rpm (Megafuge) und 4°C ultrafiltriert.

### 3.3.7.4 Entsalzung von gereinigten MHC-Klasse-I-Peptiden

Zur Entsalzung des Ultrafiltrats wurde eine Mini-Säule aus Poros R2 *reversed phase* Material hergestellt, mit 0,5 ml 50% ACN vorgespült und mit 0,5 ml Wasser äquilibriert. Nach Applikation des Filtrats wurde die Säule mit 0,5 ml Wasser gewaschen. Die Elution der Peptide erfolgte in einem Volumen von 100 µl 50% ACN. Das Eluat wurde sofort auf einer *reversen-Phase*-Säule aufgetrennt (3.4.7.5) oder für eine LC-MS-Analyse in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.3.7.5 Reverse-Phase-HPLC

Die Fraktionierung des aus MHC-Klasse-I-Molekülen gereinigten Peptidpools erfolgte auf einer Microbore-HPLC-Anlage (SMART-System). Die Peptide wurden 1:5 (v/v) mit Wasser verdünnt, auf eine RP-C2/C18 Säule (µRP-SC2.1/10; Säulendimension: 2.1 x 100 mm; Amersham) geladen und entsprechend ihrer Hydrophobizität über einen TFA/ACN-Gradienten (Eluent A: 0,1% TFA; Eluent B: 0,081% TFA in 80% ACN) aufgetrennt:

Minute	% Eluent B
0- 5	10 %
5- 15	10- 20 %
15- 75	20- 50 %
75- 85	50- 60 %
85- 87	60-100 %
87- 100	100 %

Die Auftrennung der Peptide erfolgte im linearen Gradientenbereich von 20% bis 50% Eluent B (15-75 min). Die Flußrate betrug 150 µl/min. Fraktionen zu je 150 µl wurden über die Bereiche von 20 bis 50% Puffer B automatisch gesammelt. Die UV-Detektion erfolgte bei 214 nm.

### 3.3.7.6 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die Analyse des Peptidpools endogen präsentierter MHC-Klasse-I-Liganden erfolgte mittels Elektrospray-Ionisations-(ESI) Massenspektrometrie in einem Q-ToF Massenspektrometer der Firma Micromass. Das Gerät kann im Nano-Elektrospray-Modus betrieben werden oder für die Analyse komplexer Peptidgemische mit einem HPLC-System gekoppelt werden (siehe schematische Darstellung Abb. 8). Beim Nano-Elektrospray-Modus erfolgt die Analytzufuhr aus einer Glaskapillare, die mit einer Metallschicht überzogen ist.

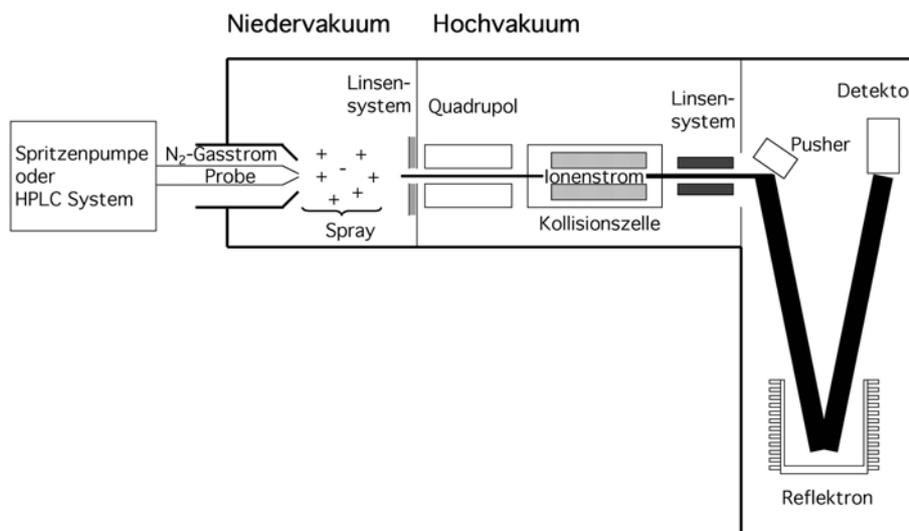


Abb. 8: Schema eines Q-ToF Massenspektrometers, verändert nach (137).

Bei der Elektrospray-Ionisierung wird eine Analytlösung bei Atmosphärendruck kontinuierlich in ein elektrisches Feld injiziert und ein Übergang der geladenen Analytmoleküle in die Gasphase herbeigeführt. Durch Kollision mit Stickstoffmolekülen am Übergang zum Massenspektrometer findet eine Desolvatisierung der Analytmoleküle statt. Anschließend erfolgt die Massenanalyse der Ionen. Die Quadrupoltechnik ermöglicht über die Massenanalyse der Ionen hinaus die Selektion von Ionen eines definierten Masse/Ladungs ( $m/z$ )-Verhältnisses. Diese können auf einer oszillierenden Flugbahn den Quadrupol

passieren und durch Kollision mit Atomen eines inerten Kollisionsgases (Argon) in der Kollisionszelle fragmentiert werden. Die Fragmentationen werden im Q-Tof durch einen TOF-Analysator und Detektor gemessen. Bei der TOF-Technik wird die Masse  $m$  der  $z$ -fach geladenen Analytationen nach Beschleunigung in einem elektrischen Feld durch die Bestimmung der Flugzeit über eine feldfreie Driftstrecke in einem Hochvakuumflugrohr bestimmt. Anhand des Fragmentspektrums (MS/MS-Spektrum) ist es anschließend möglich, die Aminosäuresequenz des Peptides zu ermitteln.

### **3.3.7.7 MS-Identifizierung endogen präsentierter MHC-Klasse-I-Peptide mit Q-Tof Massenspektrometer**

Die massenspektrometrische Analyse gereinigter, endogen präsentierter MHC-Klasse-I-Moleküle erfolgte nach zwei unterschiedlichen Strategien (*off-line* und *on-line* Technik, siehe hierzu 4.3) und wurde in Kooperation mit Frau Dr. Eva-Christina Müller (AG Prof. Wittmann-Liebold, MDC Berlin, D) durchgeführt. Bei der *off-line* Technik wurden alle 60 Fraktionen, resultierend aus einer HPLC-Vorfraktionierung endogen präsentierter MHC-Klasse-I-Peptide, auf je 2  $\mu$ l eingeeengt und mit 3  $\mu$ l Methanol/Wasser/Ameisensäure (v:v:v, 50:49:1) verdünnt. Die Proben wurden in platinbedampfte Glaskapillaren (Protana, Odense, DK) gefüllt und die Peptide entsprechend ihres Masse-Ladungsverhältnisses ( $m/z$ ) analysiert. Die Fragmentierung der Peptide erfolgte anschließend in der argongefüllten Kollisionszelle eines Q-Tof Massenspektrometers und wurde durch eine optimierte Kollisionsenergie erreicht. Die aufgenommenen MS/MS-Spektren wurden mit dem Programm MaxEnt3 (Micromass, Manchester, UK) bearbeitet. Zur Sequenzbestimmung der Peptide und Identifizierung der Proteine, aus denen diese Peptide resultierten, wurde unter Verwendung der Suchmaschine Mascot (<http://www.matrixscience.com>) in verschiedenen Protein- und Nukleinsäuredatenbanken recherchiert.

Bei der *on-line* Technik wurden unfraktionierte Peptideluate über ein Mikrokapillar HPLC-System, das an ein Q-Tof Massenspektrometer gekoppelt war, aufgetrennt und analysiert. Entsalzte Peptideluate wurden eingetrocknet, in 7  $\mu$ l Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (v:v:v, 10:89:1) resuspendiert und ein Probenvolumen von 1-6  $\mu$ l auf eine 300  $\mu$ m x 5 mm C18-Vorsäule geladen. Die Trennung der Peptide erfolgte auf einer 75  $\mu$ m x 150 mm PepMap-C18-Säule. Es wurde ein Gradient von 15-60% B über 45 min bei einer Flußrate von 5  $\mu$ l/min gefahren. Zur Reduzierung der Flußrate auf etwa 200 nl/min wurde ein Vorsäulensplit unter Verwendung eines TEE-Stücks eingesetzt. Eine beschichtete Glaskapillare (New Objective, Woburn, Manchester, USA) diente als Elektrospraykapillare. Das Massenspektrometer

wurde in einem datenabhängigen Modus betrieben. Es wurden Spektren im  $m/z$ -Bereich von 450 bis 1 000 aufgenommen. Die zu Grunde gelegten Parameter für den Wechsel zwischen MS- und MS/MS-Modus waren die detektierte Ionenintensität und der Ladungsstatus der Analytmoleküle. Drei zum gleichen Zeitpunkt eluierte Peptide konnten von dem Massenspektrometer erfaßt werden. Die Bearbeitung und Auswertung der Spektren erfolgte wie oben beschrieben.