

## 2 Material

### 2.1 Eukaryotische Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2-I aufgeführt und kurz beschrieben.

**Tabelle 2-I.** Humane Zelllinien

Zelllinie	Abstammung	HLA-Klasse I-Moleküle	Referenz
BL41	BL	A11, A32, B35, B49, Bw4, Bw6	Andersson <i>et al.</i> , 1991
BL41.B95.8	BL*	A11, A32, B35, B49, Bw4, Bw6	Andersson <i>et al.</i> , 1991
BM8.5	BL*	A1, B35, Bw6, Cw4	Spring <i>et al.</i> , 1985
BM19.7	BL*	A2, B13, Bw4	Ziegler <i>et al.</i> , 1985
BM28.7	BL*	A1, B35, Bw6, Cw4	Volz <i>et al.</i> , 1992
BM36.1	BL*	TAP-Defekt; wenig A1, B35, Bw6, Cw4	Kelly <i>et al.</i> , 1992
BM36.1/B*2705	BL*	BM36.1+B*2705, Bw4	Urban <i>et al.</i> , 1994
BJAB	BL	A1, A2, B13, B35 Bw4, Bw6, Cw4	Klein <i>et al.</i> , 1976
BJAB-B95.8.6	BL*	A1, A2, B13, B35 Bw4, Bw6, Cw4	Klein <i>et al.</i> , 1976
Bristol8	NB*	A1, A2, B8, B13, Bw4, Bw6	Snary <i>et al.</i> , 1974
BRW	NB*	A1, A2, B7, B44, Bw4, Bw6	Rosenfelder <i>et al.</i> , 1982
C1R	NB*	Cw4, wenig B35, Bw6	Zemmour <i>et al.</i> , 1992
C1R/B7	NB*	C1R+B7	Döhring und Colonna, 1996
C1R/B*2705	NB*	C1R+B*2705, Bw4	Döhring und Colonna, 1996
C1R/B37	NB*	C1R+B37, Bw4	Döhring und Colonna, 1996
C1R/B58	NB*	C1R+B58, Bw4	Döhring und Colonna, 1996
CCRF-CEM	T-ALL	A1, A30, B8, Bw6	Ihle <i>et al.</i> , 1995
DAUDI	BL*	keine HLA-Klasse I	Rosa <i>et al.</i> , 1980
H2LCL	NB*	A3, B7, Bw6 homozygot	Heinrichs <i>et al.</i> , 1980
HL60	APL	A1, B17, B44, Bw4, Cw1	Gallagher <i>et al.</i> , 1979
HUT102	TL	A30, A66.2, B17, B18, Bw6	Bunn und Foss, 1996
JAR	CC	HLA-E (intrazellulär), keine HLA-A, B, C und G	Gobin <i>et al.</i> , 1997
JEG3	CC	HLA-G und -C, keine HLA-A, B	Gobin <i>et al.</i> , 1997
JMN	T-ALL	A3, A11, B7, B35, Bw6	Schneider <i>et al.</i> , 1977
K562	CML	wenig HLA-Klasse I	Lozzio und Lozzio, 1975
KM3	VB	A23, A32, B21, B35, Bw6, Cw4	Schneider <i>et al.</i> , 1977
KR3598	NB*	A2, B44, Bw4 homozygot	Heinrichs <i>et al.</i> , 1980

LCL5.2.4	NB*	TAP-Defekt; A2, B27, Bw4	Mellins <i>et al.</i> , 1991
LCL721.221	NB*	Keine HLA-A, B, C	Shimizu <i>et al.</i> , 1988
LCL721.221/Cw1	NB*	Cw1	Colonna <i>et al.</i> , 1993
LCL721.221/Cw5	NB*	Cw5	Colonna <i>et al.</i> , 1993
LG2	NT*	A2, B*2705, Bw4 homozygot	van Els <i>et al.</i> , 1990
LY	NB*	A9, B*2705, B35, Bw4, Bw6, Cw2	Rotes Kreuz, Amsterdam
SH00	NB*	A1, A2, B8, B44, Bw4, Bw6	Rosenfelder <i>et al.</i> , 1982
T2	TB	TAP-Defekt, wenig A2	Salter <i>et al.</i> , 1986
T2/A3	TB	T2+ wenig A3	Rotes Kreuz, Amsterdam
U937	ML	A3, A19, B5, B18, Bw4, Bw6	Martin <i>et al.</i> , 1986

\* - mit EBV transformierte Zellen; APL - akute promyeloische Leukämiezelle, T-ALL - akute lymphoblastische Leukämiezelle, BL - Burkitt Lymphom (B-Lymphoblastoid-Zelle), CC - Choriocarcinoma, CML - chronische Myeloische Leukämiezelle, ML – myeloische Leukämie, NB - normale B-Zelle, NT - normale T-Zelle, TL - T-Lymphom, TB - Hybrid zwischen einer T- und einer B-Zelle, VB - B-Vorläuferzelle

## 2.2 Bakterienstämme

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind K12-Derivate. Sie sind in der Tabelle 2-II aufgeführt.

**Tabelle 2-II.** Die verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz und Funktion
JM109	e14 (mcrA), recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), supE44, relA1, Δ(lac-proAB), [F <sup>+</sup> traD36, proAB, lacI <sup>q</sup> ZAM15]	<u>Yanisch-Perron <i>et al.</i>, 1985</u> In diesem Stamm wurden die TÜ165-scFv-Fragmente exprimiert.
XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F <sup>+</sup> proAB, lacI <sup>q</sup> ZAM15, Tn10, (tet <sup>r</sup> )]	<u>Bullock <i>et al.</i>, 1987</u> In diesem Stamm wurden die TÜ165-scFv-Fragmente exprimiert.
TG1	Δ(lac-pro), supE, thi, hsdD5, [F <sup>+</sup> traD36, proA <sup>+</sup> B <sup>+</sup> , lacI <sup>q</sup> , lacZAM15]	<u>Hoogenboom <i>et al.</i>, 1991</u> Dieser Stamm unterdrückt das Amber-Stopcodon (TAG) hinter dem scFv-Gen und synthetisiert das Fusionsprotein aus scFv-Fragment und Phagenprotein pIII.
HB2151	ara, Δ(lac-pro), thi[F <sup>+</sup> proA <sup>+</sup> B <sup>+</sup> , lacI <sup>q</sup> ZAM15]	<u>Hoogenboom <i>et al.</i>, 1991</u> Dieser Stamm erkennt das Amber-Stopcodon hinter dem scFv-Gen und produziert lösliche scFv-Fragmente.

## 2.3 Vektoren, Oligonukleotide und Peptide

### 2.3.1 Vektoren

pOPE90 (Dübel *et al.*, 1993) (Abb. 2-1, a):  
Bakterieller Expressionsvektor für scFv-Fragmente.

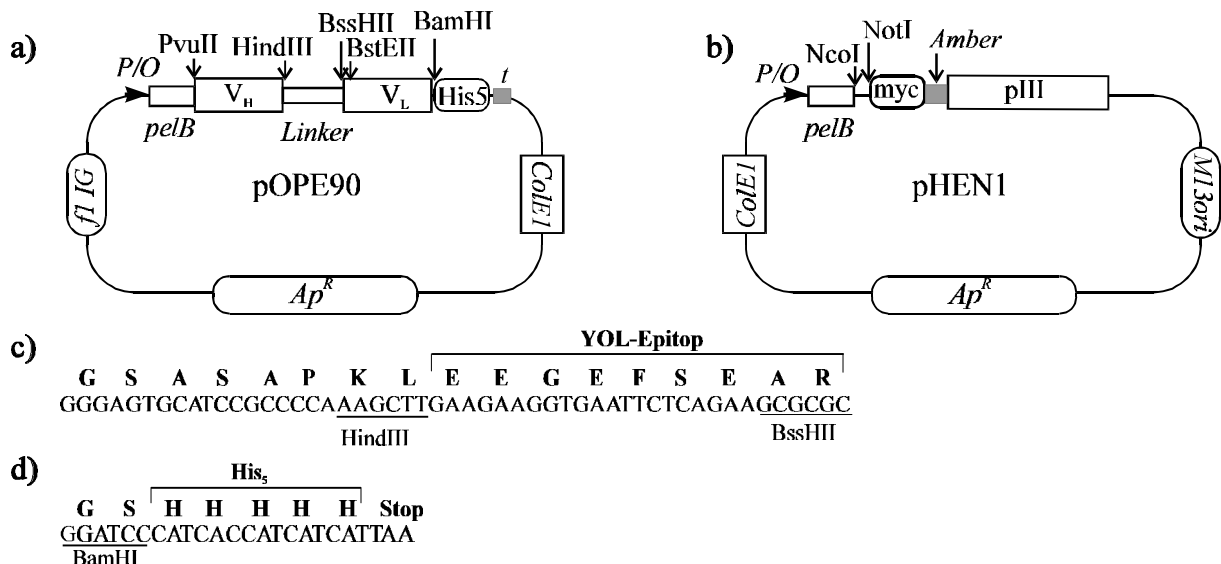
pDMI 1 (Breitling, 1991):

Dieses Plasmid enthält das Gen für den lac-Repressor ( $lacI^q$ ) und Kanamycin-Resistenz.

pHEN (Hoogenboom *et al.*, 1991) (Abb. 2-1, b):

Expressionsvektor für scFv-Fragmente und ihre Fusionsproteine mit dem Phagenprotein pIII.

Der Vektor kodiert auch für die c-myc-Sequenz, die vom mAk 9E10 erkannt wird.



**Abbildung 2-1.** Schematische Darstellung der Expressionsvektoren (a) pOPE90 und (b) pHEN.

$Ap^R$ , Ampicillin-Resistenz-Gen; *ColE1*, Replikationsursprung der Plasmid-DNA; *flIG* und *M13ori*, intergene Regionen der Phagen fl und M13; *pelB*, Signalsequenz der bakteriellen Pectatlyase; *P/O*, *lac*-Promotor/Operator; *Linker*, die  $V_H$ - und  $V_L$ -Domäne verbindende Sequenz, die ein Tubulin-Epitop enthält;  $His_5$ , die für fünf Histidinreste kodierende Sequenz; *myc*, c-myc-Sequenz. *Amber*, Amber-Stopkodon. YOL, Sequenz kodiert für das Epitop des tubulinspezifischen mAk YOL1/34.

(c) und (d), die Nukleotid- und Peptidsequenzen der Linker- und  $His_5$ -Regionen.

### 2.3.2 Synthetische Oligonukleotide

Die folgenden PCR-Primer wurden freundlicherweise von Dr. S. Dübel (Krebsforschungszentrum, Heidelberg) zur Verfügung gestellt:

$V_{\mu}F$	5'-GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTTGGGGGAGGCTT-3'
$V_{\kappa}F$	5'-TGTCTGCATCTGTAGGAGACAGGGTCACCATCAATTG-3'
$C_{\mu}B$	5'-CACAGGAGACGAGGGGGAAAAGCTTTGGGGCGGATGCACTCCCC-3'
$C_{\kappa}B$	5'-AACAGAGGCGGATCCTCATTTCAACTGCTCATCAGATGGCGGGAAGA TGAAGAC-3'

Die folgenden Oligonukleotide wurden von TIB MOLBIOL (Berlin) hergestellt:

TÜ165- $V_{\mu}$	5'-CTGTCCCAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGG-3'
TÜ165- $V_{\kappa}$	5'-GTTTCAAGGTACGCGTGAAGAAATCCAGATG-3'
TÜ165- $C_{\mu}$	5'-CGAGGGGGAAAAGCTTTGGGAAGGACTGAC-3'

TÜ165-C $\kappa$	5'-TGAGGCGGATCCAGATGTAACTGCTCACT-3'
PELseq	5'-GATGGCGCAAGTTCAGCTG-3'
YOLseq	5'-AAGGTGAATTCTCAGAAGC-3'
scFv-up	5'-CGGCCATGGCACAAGTTC-3'
scFv-do	5'-TGAGCGGCCGCAGATGTAACTGC-3'
Myc seq 10	5'-CTCTTCTGAGATGAGTTTTTTG-3'
LMB3	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
PCR-H-Link	5'-ACCGCCAGAGCCACCTCCGCC-3'

### 2.3.3 Peptide

Die Peptide wurden von Alta Bioscience, University of Birmingham (UK) hergestellt.

EBNA:	LPLDITPY (Derivat des Peptids LPPHDITPY des EBNA3C-Proteins des Epstein-Barr-Virus)
nef:	VPLRPMTY (Dieses Oktapeptid stammt aus dem nef-Protein des Humanen Immundefizienz-Virus und wird von HLA-B*3501 präsentiert, der Komplex jedoch nicht von TÜ165 erkannt.)

## 2.4 Antikörper

**Tabelle 2-III.** Beschreibung der eingesetzten monoklonalen Antikörper.

Antikörper	Spezifität
W6/32.HL, IgG2 $\alpha$ (Barnstable <i>et al.</i> , 1978)	Dieser mAk erkennt HLA-Klasse I-Moleküle, wenn sie $\beta_2$ -Mikroglobulin gebunden haben.
W6/32.HK, IgG2 $\alpha$ (Ziegler und Milstein, 1979)	Inaktive Variante von W6/32.HL, dieser mAk reagiert nicht mit HLA-Klasse I-Molekülen.
TÜ25, IgM $\kappa$ (Uchanska-Ziegler <i>et al.</i> , 1993)	Dieser mAk ist spezifisch für epitheliale Zellen und dient als negative Isotypkontrolle für IgM-Antikörper gegen HLA-A, B, C.
HC10, IgG2 $\alpha$ (Stam <i>et al.</i> , 1986)	Dieser mAk erkennt denaturierte und einzelne schwere Ketten der HLA-B und HLA-C-Moleküle.
TÜ149, IgG2 $\alpha$ (Uchanska-Ziegler <i>et al.</i> , 1993)	Der mAk reagiert mit nativen schweren Ketten der HLA-B und HLA-C-Moleküle, wenn sie sich in Verbindung mit humanem $\beta_2$ -Mikroglobulin befinden.
SFR8-B6, IgG2b (Radka <i>et al.</i> , 1982)	Dieser mAk der Ratte erkennt die Bw6-Determinante auf HLA-B und -C-Molekülen.
TÜ165, IgM $\kappa$ (Uchanska-Ziegler <i>et al.</i> , 1993)	Der mAk erkennt HLA-B35-Moleküle, wenn sie gewisse Peptide des Epstein-Barr-Virus gebunden haben.
TÜ110, IgG2 $\alpha$ (Müller <i>et al.</i> , 1983)	Dieser mAk reagiert mit HLA-B13-Molekülen.
Myc1-9E10, IgG1 (Evan <i>et al.</i> , 1985)	Der mAk reagiert mit dem humanen p62c-myc Genprodukt und ist spezifisch für das C-terminale Peptid G.

YOL1/34*, IgG2a (Kilmartin <i>et al.</i> , 1982)	Dieser mAk der Ratte erkennt die Aminosäuresequenz EEGEFSEAR des $\alpha$ -Tubulins.
---	---

\* - Dieser mAk wurde käuflich erworben (Camon). Die restlichen Antikörper wurden im Institut für Immungenetik hergestellt und in Form des unverdünnten und ungereinigten Kulturüberstands der Myelomhybridzellen eingesetzt.

Schaf-anti-M13-Serum:	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG (H+L), Peroxidase-Konjugat:	BioRad
Ziege-anti Ratte-IgG(H+L), Peroxidase-Konjugat:	BioRad
Esel-anti-Schaf-IgG, Peroxidase-Konjugat:	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG (H+L), FITC-Konjugat:	Caltag Laboratories
Ziege-anti-Ratte-IgG (H+L), FITC-Konjugat:	Caltag Laboratories
Esel-anti-Schaf-IgG, FITC-Konjugat:	Serotec

## 2.5 Enzyme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme PvuII, HindIII, BssHI, MluI, HindIII, NcoI, NotI, Bsu36I und MvaI wurden von den Firmen Stratagene, Boehringer Mannheim, Pharmacia, Amersham-Buchler oder New England Biolabs bezogen. Die Restriktions-Verdaus wurden nach Vorschrift der Hersteller mit den mitgelieferten 10-fach konzentrierten Puffern durchgeführt.

## 2.6 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Aminocapronsäure	Sigma, München
Ampicillin	Sigma, München
L-Argininchlorid	Sigma, München
Bacto-Agar	Difco, USA
Bacto-Trypton	Difco, USA
Bacto-Yeast	Difco, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
4-Chloro-1-Naphthol	Sigma, München
D+Glucose	Merck, Darmstadt
Dimethyldichlorsilan (Repel-Silan)	Sigma, München
Dimethylsulfoxid	Sigma, München
Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco-BRL, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva, Heidelberg
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Serva, Heidelberg

Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco-BRL, Karlsruhe
Gentamycin	Gibco-BRL, Karlsruhe
L-Glutamin (200 mM)	Seromed, Berlin
Glycin	Serva, Heidelberg
Guanidinhydrochlorid	Sigma, München
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Seromed, Berlin
Harnstoff ( <i>ultra pure</i> )	Sigma, München
Imidazol	Merck, Darmstadt
Ionenaustauscher AG 501-X8(D)	Bio-Rad, München
Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, München
$\epsilon$ -Aminocaprinsäure	Sigma, München
Mercaptoethanol	Sigma, München
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
Mineralöl	Sigma, München
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat (100 mM)	Seromed, Berlin
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma, München
Penicillin/Streptomycin (10 $\mu$ g/ml)	Seromed, Berlin
Phenylmethansulfonsäurefluorid (PMSF)	Sigma, München
Polyethylenglycol 6000 (PEG)	Sigma, München
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
RPMI 1640 Medium mit Glutamax-I (RPMI)	Gibco-BRL, Karlsruhe
Sucrose	Sigma, München
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma, München
N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Triethylamin	Merck, Darmstadt
Tris	Sigma, München
Triton X-100	Sigma, München
Tween 20 (Polyoxyethylen Sorbitan Monolaurat)	Sigma, München
Wasserstoffperoxid (30%)	Sigma, München
Xylencyanol	Sigma, München
Anorganische Salze, Säuren und Alkohole stammten von Merck (Darmstadt) und Sigma (München) und sind, soweit nicht anders vermerkt, vom Reinheitsgrad p.a.	

## 2.7 Allgemeine Medien, Puffer und Lösungen

Für alle Lösungen wurde doppelt destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) verwendet. Die Angabe “%” entspricht bei Feststoffeinwägen w/v und bei Flüssigkeiten v/v.

### Kultur- und Einfriermedien für Bakterien

#### LB-Medium

Bacto-Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l

#### 2xYT-Medium

	Bacto-Trypton	16 g
	Hefeextrakt	16 g
	NaCl	5 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
TYE-Medium		
	Bacto-Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	8 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
Einfriermedium für Bakterien		
	Glycerol	4 ml
	LB-Medium	6 ml
Top-Agar		
	Bacto-Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	Bacto-Agar	7 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
TYE-Platten:	1 l TYE-Medium mit 15 g Bacto-Agar	
LB-Platten:	1 l LB-Medium mit 15 g Bacto-Agar	
Bei Antibiotikaselektion wurden den Medien und Platten Ampicillin (50 µg/ml oder 100 µg/ml) und/oder Kanamycin (50 µg/ml) zugefügt.		

Kultur- und Einfriermedien für eukaryotische Zellen

Kulturmedium DMEM mit FCS

DMEM	500 ml
FCS	5%
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
Natriumpyruvat	1 mM

Kulturmedium RPMI mit FCS

RPMI 1640	500 ml
FCS	10%
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
Natriumpyruvat	1 mM

Einfriermedium für die Zellkultur

DMSO	10%
FCS	90%

Allgemeine Puffer und Lösungen

PBS-Puffer

	NaCl	137 mM
	KCl	27 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	81 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17 mM
	pH 7.4 wird mit 1 M HCl eingestellt.	
PBST-Puffer:	1xPBS mit 0,05 % Tween	
10xTBE-Puffer		
	Tris (Base)	900 mM
	Borsäure	900 mM
	EDTA	10 mM
10xTAE-Puffer		
	Tris (Base)	400 mM
	Na-Acetat	200 mM
	EDTA	10 mM
	pH 8.2 wird mit Essigsäure eingestellt.	
TE-Puffer		
	Tris-HCl (7,4)	10 mM
	EDTA	1 mM