

## 4. Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

#### **Extraktion und Ethanol­fällung von DNA oder RNA**

Die zu extrahierende DNA oder RNA wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, stark gevortext und 3 Minuten bei 13000 Upm in einer Minizentrifuge zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgezogen und mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, stark gevortext und erneut abzentrifugiert. Die obere Phase wurde abermals abgezogen und weiterverarbeitet.

Die zu fällende DNA oder RNA wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaAc pH 5,2 und 1 µl Glycogen versetzt und mit dem 2,5 fachen Volumen eiskaltem 95 % Ethanol (DNA) oder mit eiskaltem 70 % Isopropanol (RNA) für 20 Minuten bei -70 ° C gefällt. Nach einer Zentrifugation bei 13000 Upm für 15 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und die DNA/RNA mit 70 %igem eiskaltem Ethanol gewaschen.

#### **Restriktionsverdau und Erzeugung von glatten Enden der DNA**

Jeder analytische Verdau wurde mit ca. 1 µg DNA durchgeführt, ein präparativer mit etwa 5 µg. Die einzusetzenden Puffer wurden nach den Anleitungen der einzelnen Firmen gewählt, von denen das jeweilige Enzym war. Von den Restriktionsenzymen wurden im analytischen Verdau 0,5 - 1 µl eingesetzt, im präparativen 1 - 3 µl. Die Reaktion wurde 1 h bei 37 ° C durchgeführt, sofern die optimalen Bedingungen nicht bei 56 ° C lagen. Wenn zwei Enzyme unterschiedliche Temperatur- oder Pufferbedingungen forderten, wurden die Verdau nacheinander angesetzt.

Die Reaktion zur Erzeugung glatter Enden wurde mit der gesamten verdauten DNA-Menge durchgeführt. Dazugegeben wurden T4-Polymerase-Puffer, dNTPs und T4-Polymerase, und anschließend wurde für 30 Minuten bei 37 ° C inkubiert.

Um die Religation geschnittener DNA-Enden zu verhindern, wurden die (überstehenden) Phosphatenden mit alkalischer Phosphatase behandelt. Die Reaktion lief bei überstehenden 5'-Phosphatenden 15 Minuten bei 37 ° C, bei glatten Enden und 3'-Überhängen bei 56 ° C. Nach dieser Zeit wurde nochmals 1 µl CIP hinzugegeben und

ebenso inkubiert. Anschließend wurde die CIP inaktiviert, indem mit 1/10 Volumen 0,1M TNE für 10 Minuten bei 75 ° C erhitzt wurde.

### **DNA-Agarose-Gelelektrophorese**

Eine 1 %ige Agaroselösung wurde in 1 x TAE durch 2 minütiges Erhitzen in der Mikrowelle hergestellt, ca. 0,6 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt und in eine Flachbettelektrophoresekammer gegossen. Nachdem die Agarose fest war, wurde der Kamm entfernt und die DNA-Proben mit 1/6 Volumen Probenpuffer in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 Volt in 1x TAE für etwa 45 Minuten. Auf einem UV-Transluminator wurde das Gel bei 260 nm fotografiert, bzw. bei 315 nm bei präparativen Verdaus, um keine Mutationen der DNA hervorzurufen.

### **DNA-Extraktion aus Agarosegelen**

Die Extraktion der DNA aus Agarosegelen wurde mit der Methode der Firma Qiagen durchgeführt. Nach dem Ausschneiden der Fragmente aus dem Gel bei 315 nm wurden diese gewogen und mit dem dreifachen Volumen an QX1-Puffer versetzt. Während der Inkubation für 10 Minuten bei 50 ° C wurde die Lösung mehrfach geschüttelt. Anschließend wurde ein Gelvolumen Isopropanol hinzugegeben und gemischt. Der Ansatz wurde auf die QIAquick Säule pipettiert und bei 6000 Upm 1 Minute zentrifugiert. Nach der Entfernung des Filtrats wurden zum Waschen der Säule 750 µl Puffer PE eingesetzt und 1 Minute bei 6000 Upm zentrifugiert. Nach dem Wegschütten des Filtrats wurde die Säule nochmals 1 Minute bei 6000 Upm zentrifugiert und anschließend in ein Eppendorfgefäß gestellt. Um die DNA zu eluieren, wurden 30 µl TE-Puffer auf die Säule gegeben, 1 Minute stehengelassen und zuletzt bei 6000 Upm für 1 Minute zentrifugiert.

### **Ligation von DNA-Fragmenten und Transformation von Bakterien**

Von dem aus dem Gel eluierten DNA-Fragment und dem verdauten Vektor wurden jeweils etwa 1 µg eingesetzt. Die Ligrationsreaktion wurde mit 1 Unit Ligase, 5x Ligasepuffer und Wasser angesetzt. Es wurde 20 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend der gesamte Ansatz zur Transformation eingesetzt.

Der Ligrationsansatz wurde mit mindestens 20 µl der E.coli XL-1-blue-Suspension versetzt, 30 Minuten auf Eis inkubiert und für 3 Minuten einem Hitzeschock bei 37° C

unterzogen. Anschließend wurden die Zellen in Petrischalen auf LB-Agarose-Medium mit Ampicilin (100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37° C in den Brutschrank gestellt.

Jeweils ein Bakterienklon wurde am nächsten Tag von der Petrischale gepickt und für Mini-Präparationen in 2ml LB-Medium mit Ampicilin (1100 µg/ml) gegeben. Für Maxi-Präparationen wurde ein Bakterienklon in 100 ml LB mit den oben genannten Antibiotika gegeben. Über Nacht wurde bei 37 °C und 300 Upm geschüttelt und anschließend eine Plasmidisolierung durchgeführt.

## **Plasmidisolierung**

### Mini-Präparation

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus E.coli XL1-Blue-Zellen wurde nach der Methode von Qiagen durchgeführt. Dazu wurde von der über Nacht gewachsenen 2 ml Kultur 1,5 ml abgenommen und 2 Minuten bei 13000 Upm in der Minizentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl Puffer P1 gelöst, mit 250 µl Puffer P2 versetzt, 4-6 mal geschwenkt und mit 350 µl Puffer N3 sofort gemischt. Nach einer Zentrifugation für 10 Minuten bei 13000 Upm wurde der Überstand auf die QIAprep Säule gegeben und 1 Minute bei 6000 Upm zentrifugiert. Sie wurde nach dem Entfernen des Filtrats mit 750 µl Puffer PE gewaschen und nach einer Zentrifugation bei 6000 Upm und dem Weggießen des Filtrats ein weiteres Mal zentrifugiert. Zur Elution der DNA wurden 50 µl TE-Puffer auf die Säule gegeben und nach 1 Minute bei 13000 Upm 2 Minuten herunterzentrifugiert.

### Maxi-Präparation

Die Isolierung großer Mengen an Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Qiagen durchgeführt. Die über Nacht gewachsene 100 ml Kultur E.coli XL1-Blue-Zellen wurde in 50 ml Röhrchen gefüllt und 15 Minuten bei 6000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde erst in 1 ml Puffer P1 resuspendiert und anschließend mit weiteren 9 ml versetzt. Nach der Zugabe von 10 ml Puffer P2 und der Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden 10 ml Puffer P3 hinzugefügt und der Ansatz sofort geschwenkt. Einer Inkubation für 20 Minuten auf Eis folgte eine Zentrifugation bei 6000 Upm für 15 Minuten. Der Überstand wurde auf einen Gaze-Filter gegeben und auf die mit 10 ml Puffer QBT equilibrierte Säule filtriert. Nach dem Durchfließen des Überstands wurde

die Säule mit 2 x 30 ml Puffer QC gewaschen. Die DNA wurde mit 15 ml Puffer QF eluiert und mit 15 ml Isopropanol gefällt. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 15000 Upm für 30 Minuten im SS34-Rotor der Sorvall-Zentrifuge. Der Überstand wurde danach vorsichtig abpipettiert und das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und nochmals 2 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert. Nach gutem Trocknen wurde es in 500 µl TE-Puffer gelöst.

### DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem T7- und SP6-Polymerase-Kit von Amersham-Pharmacia nach der Methode von Sanger. Zuerst wurde die DNA im Alkalischen denaturiert (5 min bei 65 °C), anschließend neutralisiert und mit einem Primer hybridisiert. Nach Zufügen der T7- oder SP6-Polymerase und der Nukleotidmischung aus Desoxynukleotiden und Didesoxynukleotiden wurde die Reaktionsmischung 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Es wurde dann mit DNA-Probenpuffer gestoppt und die Proben auf Eis gestellt. Zum Beladen des Sequenziergels wurden sie kurz auf 95 °C erhitzt.

## 4.2 Proteinchemische Methoden

### 4.2.1 Analytische Methoden

#### SDS-PAGE (nach Laemmli, 1970)

Ansatz für 2 Maxi-Gele (für Probenvolumina zwischen 30µl und 100µl), beim Mini-Gel die Hälfte

#### SDS-PAGE Trenngel (10 % AA):

Trenngelpuffer	15	ml
Wasser	25	ml
Acryamidlösung	20	ml
TEMED	90	µl
APS	90	µl

#### SDS-PAGE Trenngel (15 % AA):

Trenngelpuffer	15	ml
Wasser	20	ml
Acryamidlösung	25	ml
TEMED	80	µl
APS	80	µl

SDS-PAGE Sammelgel:

Sammelgelpuffer	5	ml
Wasser	12,4	ml
Acryamidlösung	2,6	ml
TEMED	40	µl
APS	40	µl

Es wurde eine gesättigte Lösung von APS in Wasser hergestellt. Das Trenngel wurde nach dem Ansetzen einer 10 % oder 15 % Lösung und Versetzen mit APS und TEMED schnell zwischen die Gelplatten gegossen und mit 1 ml Wasser überschichtet. Die Polymerisation erfolgte innerhalb von 20 Minuten. Das Wasser wurde mit einem Filterpapier entfernt und das Sammelgel nach kurzem Schwenken auf das Trenngel gegossen, wobei ein 10 oder 15 Taschen bildener Kamm verwendet wurde. Die zu analysierenden Proben wurden in 6x Probenpuffer aufgenommen und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei Maxi-Gelen bei 80 Volt und nach oben offener Stromstärke ca. 16 h lang, bei Minigelen bei konstanten 38 mA für 1,5 Stunden (Spannung auf 140 Volt begrenzen).

**Blotting von SDS-PAGE Gelen**

Die Puffer (siehe Material) müssen frisches Methanol enthalten, deshalb wurde vor dem Blotten folgendes angesetzt (für 2 große Gele):

Konzentrierter Anodenpuffer:

150	ml	Anodenpuffer
10	ml	Wasser
40	ml	Methanol

Anodenpuffer:

15	ml	Anodenpuffer
177	ml	Wasser
48	ml	Methanol

Kathodenpuffer:

150	ml	Kathodenpuffer
10	ml	Wasser
40	ml	Methanol

Es wurden drei in Größe der Blottkammer zurechtgeschnittene Filterpapiere zunächst in konzentrierten Anodenpuffer gelegt und auf der Blottkammer mit einer Glaspipette glattgestrichen. Drei weitere in konzentriertem Anodenpuffer und drei in Anodenpuffer getränkte Filterpapiere wurden darauf gelegt. Die PVDF-Membran wurde ca. 1 Minute in Methanol, anschließend in Wasser und daraufhin kurz in Anodenpuffer gelegt, um sie vollständig zu benetzen. Nachdem die Membran auf die Blottkammer mit Filterpapieren gelegt wurde, wurde das Gel oben luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Abschließend folgten noch drei in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere. Geblottet wurde 1,5 h bei 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Gel, was im Fall des Maxigels oder zweier Minigele auf der Blottapparatur 180mA entspricht. Die Membran wurde dann in Milchpulverlösung gelegt.

### **Proteinnachweis auf Western Blots**

Die Membran wurde 1 h in der Milchpulverlösung geschwenkt, um die Möglichkeit einer unspezifische Bindung von Antikörpern zu reduzieren. Nach kurzem Schwenken in PBS/Tween wurde der Erstantikörper in PBS/Tween/BSA auf die Membran gegeben und für eine weitere Stunde geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen von jeweils 10 Minuten in PBS/Tween wurde der Peroxidase-konjugierte Zweitantikörper mit einer 1:200000 Verdünnung in PBS/Tween/BSA gelöst und für 45 Minuten auf der Membran gelassen. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde die Membran 20 Sekunden in ECL (Enhanced chemiluminescence)-Lösung gelegt, um die Peroxidasereaktion auszulösen. Auf dem Lumi-Analyst-Schirm wurde eine Expositionszeit von 30 Sekunden bis 20 Minuten gewählt.

### **Proteinnachweis mit Coomassie-Blau**

Das Gel oder die Membran wurde je nach Proteinmenge 10 bis 30 Minuten in der angesetzten Lösung geschwenkt. Nach dem Abgießen der wiederverwendbaren Färbelösung wurde die Membran oder das Gel in Fixiererlösung gelegt und so lange entfärbt bis der Hintergrund ausreichend hell erschien. Nach kurzem Schütteln in Wasser wurde das Gel auf dem Geltrockner 2 h bei 80 °C getrocknet. Dazu wurde das Gel auf ein Filterpapier gelegt, mit Frischhaltefolie bedeckt und so auf die Geltrockner gelegt.

### **Proteinnachweis von <sup>35</sup>S-markierten Proteinen**

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurde das Gel 1 h in Fixierer geschwenkt, 2 x 15 Minuten mit DMSO geschüttelt, 30 Minuten mit Rotifluoreszint imprägniert und als letztes gründlich mit Wasser gewaschen (ca. 5x 10 Minuten). Auf einem Geltdrockner wurde das Gel 2 h bei 80 ° C getrocknet und anschließend auf einen Röntgenfilm gelegt. Der Film wurde nach 2 bis 7 Tagen entwickelt und mittels Lumi-Analyst-Software quantifiziert.

### **ELISA**

Zunächst wurde die Testplatte mit dem Antikörper beschichtet, der immobilisiert werden sollte (z.B.: 1B5). In jedes Loch der Platte wurden 100 µl als Verdünnung mit Carbonatpuffer pipettiert (Endkonzentration 1 µg/ml). Es wurde über Nacht bei 4 ° C inkubiert und dann die Flüssigkeit abgegossen. In jedes Probenloch wurden 200 µl PBS-Tween gegeben und die Waschflüssigkeit wiederum abgegossen. Der Waschvorgang wurde wiederholt und die Platte anschließend auf saugfähiges Papier aufgeschlagen. Um unspezifische Bindungen zu unterdrücken, wurde in jedes Testloch 200 µl Blockpuffer pipettiert, der Deckel aufgelegt und für 1 h bei 37 ° C oder Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden als Verdünnung in PBS-Tween angesetzt und in 100 µl Portionen in die Löcher pipettiert (geeignete Verdünnungen: 1:1000 bis 1:1000000). Es wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 4 x mit PBS-Tween gewaschen. Das Konjugat (z.B.: GAHu-Pox) wurde in PBS-Tween 1:5000 verdünnt und davon 100 µl eingesetzt. Nach der Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur wurde 5 x mit PBS-Tween gewaschen und für die Substratreaktion 11 mg Orthophenylendiamin (OPD) in 11 ml Substratpuffer aufgelöst (1 mg/ml). Dazu wurden 11 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gegeben und rasch in jedes Testloch 100 µl pipettiert. Nach 1-10 Minuten bei abgedeckter Platte wurden 50 µl Schwefelsäure (2 M) hinzugegeben und eine photometrische Auswertung bei 492 nm durchgeführt.

### **Proteinbestimmung nach Bradford**

Es wurde eine 40% Lösung der BioRad-Proteinbestimmungslösung in PBS angesetzt. Als Proteinstandard wurde BSA in Verdünnungen von 1 ng/ml bis 10 mg/ml verwendet. Die Proben wurden in 96-Loch-Platten pipettiert, wobei versucht wurde, durch

Verdünnung mit PBS eine Endkonzentration von etwa 1mg/ml zu erreichen. Von der Bradford-Stammlösung wurden 50µl dazugegeben und alles bei 595 nm im ELISA-Reader gemessen.

## 4.2.2 Biochemische Methoden

### Kupplung von Antikörpern an Cyanobromid-aktivierte Sepharose

Der zu kuppelnde Antikörper wurde mittels Dialyse über Nacht in Carbonatpuffer umgepuffert. Dazu wurde die Antikörperlösung in einen Dialyseschlauch gegeben und in einem mit Carbonatpuffer gefüllten Becherglas über Nacht gerührt. Die benötigte Sepharose errechnete sich folgendermassen: 1 ml Sepharose bindet 5-10 mg Protein und 1 mg ergibt ca. 3,5 ml Gel. Das in Salzsäure gequollene Gel wurde mehrmals mit Carbonatpuffer gewaschen. Die Antikörperlösung auf eine Konzentration von ca. 1-2 mg/ml eingengt, anschließend 1h mit dem Gel bei Raumtemperatur gerollt oder über Nacht bei 4 °C. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurden die Beads 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit Blockpuffer gecappt. Das Gel wurde dann dreimal abwechselnd mit Acetatpuffer und Tris-Puffer gewaschen. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit PBS. Gelagert wurden die Beads bei 4 °C in PBS mit 0,1 % Natriumazid.

### Immunpräzipitation

Der präzipitierende Antikörper wurde durch Inkubation bei 4 °C für 1 h an die Protein-A Sepharose gebunden. Wenn dieser keinen IgG2a- oder IgG2b-Isotyp hatte, wurde der Zwischenantikörper Kaninchen-gegen-Maus (RaM) vorgebunden und nach zweimaligem Waschen mit TBS der präzipitierende Antikörper ebenfalls 1 h bei 4 °C absorbiert. Ohne Zwischenantikörper wurde teilweise auch Protein A/G-Agarose verwendet, wenn ein IgG1-Isotyp vorlag. Bei Präzipitation CNBr-aktivierter Sepharose war der Erstantikörper bereits kovalent gekoppelt. Um monoglykosylierte Proteine zu präzipitieren, wurde Concanavalin A-Sepharose verwendet. Es wurde ein Detergenzlysat von Zellen auf die entsprechenden Beads gegeben und 1 h bei 4 °C rotiert. Gewaschen wurde anschließend 2 x mit TBS ohne oder stringenter mit 0.1% Detergenz.

### **Thermostabilitätsassay von MHC-Klasse-I-Molekülen im Lysat**

Nach der Lyse von Zellen (siehe 3.3.1) wurden die zellkernfreien Überstände entweder bei 4 °C oder bei 37 °C für 1 h inkubiert. Die verbleibenden MHC-Klasse-I-Moleküle wurden durch eine Immunpräzipitation mit den Antikörpern W6/32 oder Y3 herausextrahiert und mittels Western-Blot mit dem Antikörper HC-10 bzw. dem anti-P8 Serum nachgewiesen.

### **Bestimmung der Endoglykosidase H-Resistenz von Proteinen**

Das Lysat oder das Immunpräzipitat wurde mit Endoglykosidase-H-Puffer verdünnt oder aufgenommen, wobei beachtet wurde, daß in eine Mini-Geltasche bis zu 30µl und in eine Maxi-Gel-Tasche (10er Kamm) maximal 100µl passen. Für etwa  $2 \times 10^6$  Zellen wurden 2 µl Endo H (Stammlösung: 2.5u/500µl) eingesetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **Peptidisolierung für Massenspektroskopie**

Es wurden  $2-4 \times 10^7$  Zellen (ca. 200 µl Pellet) abzentrifugiert und 2x mit D-PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml 1 % NP40-Lysepuffer hinzugefügt und 1 h bei 4 °C lysiert. Nach dem zweimaligen Abzentrifugieren für jeweils 10 Minuten bei 13000 Upm wurde der Überstand durch einen Millipore-Filter (Porengröße 0,45 µm) gedrückt, wobei ein dreiteiliger Set mit 5 ml Spritze benutzt wurde. Die Präzipitation von MHC-Klasse-I-Molekülen erfolgte durch 40 µl W6/32-Beads (CNBr-aktivierte Sepharose mit gekuppeltem Antikörper), die mit dem Überstand 2 h bei 4 °C rotierten. Es wurde 5 x mit Waschpuffer I und 5 x mit Waschpuffer II in der Tischzentrifuge gewaschen, um NP40 auszutreiben. Anschließend wurden die W6/32-beads in eine kleine Biorad-Säule überführt und 1 x mit Waschpuffer II nachgewaschen. Zur Elution der Klasse-I-Moleküle wurden die Biorad-Säulchen auf Eis in Reagenzgläser gehängt und 1 ml Elutionspuffer in die Säule geben. Rasch wurde gleich nochmal 1 ml hinzupipettiert und das Eluat schnell mit 9 µl 37 % HCl neutralisiert. Der Elutionsvorgang wurde nochmal mit 2 x 1 ml Elutionspuffer + 9 µl HCl wiederholt. Die 4 ml Eluat wurden möglichst schnell über einem 30 kDa Millipore-Filter zentrifugiert und 7–8 x mit HPLC Wasser gewaschen. Die Peptidelution erfolgte mit 2 µl TFA in 60 µl HPLC-Wasser, die 30 Minuten bei 37 °C mit den Beads inkubiert wurden. Nach der Zentrifugation für 1 Minute bei 13000 Upm in der Tischzentrifuge wurden nochmals 1 µl TFA mit 30 µl Wasser auf die Beads gegeben

und gleich abzentrifugiert. Die Probe wurde 45 Minuten in der Vakuumzentrifuge lyophilisiert und bei 4 ° C gelagert, bis die Messung am MALDI-Spektrometer erfolgte. Die Probe wurde in 0,5 µl Matrixlösung auf einen MS-Probenhalter pipettiert. Die trockene Probe wurde ins Spektrometer gebracht und analysiert.

## 4.3 Zellbiologische Methoden

### 4.3.1 Zellkultur

#### Kultivierung eukaryontischer Zellen

Alle Suspensionszellen wurden in RPMI mit genannten Zusätzen oder Selektionsreagenz kultiviert. Es wurde versucht, bei einer Zelldichte von  $4 \times 10^5$ /ml bis  $1 \times 10^6$ /ml zu kultivieren, bei der Zelllinie 721.220 eher im höheren Bereich. Der Brutschrank wurde auf 37 ° C, 95 % Luftfeuchtigkeit bei 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt eingestellt. Zur Gewinnung des Zellpellets wurde bei 600 g für 2 Minuten abzentrifugiert.

#### Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden ca.  $10^6$  Zellen abzentrifugiert, in 1 ml RPMI:FCS:DMSO (5:4:1) aufgenommen und schnell in 70 ° C eingefroren.

Zum Auftauen wurde der Inhalt eines Röhrchen schnell im 37 ° C Wasserbad aufgetaut, sofort in 10 ml RPMI oder DMEM gegeben und 2 Minuten bei 600 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Vollmedium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt.

#### Transfektion mittels Elektroporation

Die Transfektionen wurden in 1 ml Kunststoffküvetten mit einer Spaltbreite 0,2 cm durchgeführt. Nach dem Spülen mit 100 % Ethanol wurden die Küvetten zum Trocknen aufgestellt. Es wurden jeweils je 5-10 µg DNA in einem sterilen Eppendorfgefäß vorgelegt. Die Zellen wurden nach dem Abzentrifugieren des Mediums bei 2000 Upm für 2 Minuten in Transfektionsmedium (DMEM mit 20mM HEPES ohne andere Zusätze) aufgenommen. Pro Ansatz wurden  $2-5 \times 10^6$  Zellen in 300 µl Transfektionsmedium zu den vorgelegten DNA-Lösungen pipettiert, kurz gründlich gemischt und in die Küvetten gegeben. Auf Eis wurde etwa 5 Minuten lang inkubiert, bevor die Küvetten in die

Reaktionskammer des Elektroporationsgeräts gestellt und elektroporiert wurden. Die Transfektionsbedingungen waren am Elektroporationsgerät der Firma BTX 220 Volt, 3 Pulse, 4 msec. Nach der Elektroporation wurden die Zellen wiederum 5 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Ansätze in Kulturflaschen gegeben und mit RPMI-Vollmedium versetzt. Um die gewünschten positiven Transfektanten zu selektieren, wurde Hygromycin zunächst in einer Konzentration von 0,5 mg/ml in die Flaschen gegeben. Nach 40-48 h wurde den Transfektanten neues Medium gegeben und sobald positive Klone heranwuchsen auf 0,3 mg/ml Hygromycin weiterselektiert.

### **Transfektion mittels Superfect-Reagenz**

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in 6-Loch-Gefäßen ausgesäht. Pro Loch wurden  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Am nächsten Tag wurden 2 µg DNA in Eppendorfgefäße vorgelegt und mit DMEM-Transfektionsmedium auf 100 µl aufgefüllt. Nach kurzem Mischen wurden 10 µl Superfect-Reagenz hinzugegeben. Die Lösung wurde wiederum durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und anschließend bei Raumtemperatur für 5-10 Minuten stehengelassen. Währenddessen wurden die Zellen pro Ansatz mit 4 ml D-PBS gewaschen. Zu der DNA-Lösung wurden dann 600 µl DMEM Vollmedium ohne Antibiotika gegeben und nach kurzem Mischen auf die Zellen pipettiert. Die Transfektion erfolgte 2-3 Stunden im Brutschrank. Danach wurden die Zellen mit 4 ml PBS gewaschen und mit 1 ml DMEM Vollmedium mit Antibiotika versetzt. Es folgte eine Inkubation für 40-48 Stunden im Brutschrank bis die Zellen analysiert wurden.

### **Lyse von Zellen**

Zur Lyse mit den Detergenzien Nonidet-P40 (NP40) oder Digitonin wurden die Zellen abgezählt, einmal mit D-PBS gewaschen und in einer 1 % Lösung von Detergenz in TBS mit Proteaseinhibitor aufgenommen. Nach einer Inkubation von ca. 30 Minuten auf Eis wurden die Zellkerne bei 13000 Upm und 4° C in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand in die Versuche eingesetzt. Bei einer Lyse durch SDS wurde SDS-Probenpuffer schnell auf die Zellen pipettiert und sofort schüttelnd auf 95 °C gestellt. Nach ca. 10 Minuten wurde das Präzipitat für 5 Minuten bei 13000 Upm abzentrifugiert.

### **Mikrosomenpräparation**

Es wurden Zellen bei 2000 Upm pelletiert, in wenig Mikrosomenpuffer aufgenommen und dreimalig einem kurzen Kälteschock in flüssigem Stickstoff und einem Auftauschritt bei 37 °C im Wasserbad unterzogen. Die entstandenen Zelltrümmer wurden durch 2-minütiges Zentrifugieren bei 2000 Upm in der Tischzentrifuge abgetrennt. Der mikrosomenhaltige Überstand wurde für 10 Minuten bei 4 °C und 13000 Upm zentrifugiert. Die im Pellet vorhandenen Mikrosomen wurden in Mikrosomenpuffer bei -20 °C gelagert.

### **Concavalin-A-Stimulation von Maus-Milzzellen**

Nach der Isolierung der Maus-Milzen wurden sie vorsichtig durch ein Edelstahlsieb gerieben, um Einzelsuspensionen herzustellen. Die Zellen von 2 Milzen wurden in 50 ml Vollmedium für 48 Stunden mit 5µg/ml Concanavalin A inkubiert.

## **4.3.2 Zellfärbungen**

### **FACS-Analyse und FACS-Sortierung**

Die Zellen wurden für eine FACS-Messung zunächst gezählt und 5-10x10<sup>5</sup> Zellen pro Färbung verwendet. Nach der Zentrifugation für 2 Minuten bei 600 g und Abgießen des Mediums standen die Zellpellets einige Minuten in azidhaltigem D-PBS auf Eis, um die Biosynthese vollständig zu stoppen. Die Antikörper wurden entweder als Hybridomüberstand mit 0,05 % Azid versetzt oder als gereinigter Antikörper in D-PBS/0,05% Azid (FACS-Medium) zum Färben eingesetzt (etwa 10 µg). Der Erstantikörper wurde 30-60 Minuten auf den Zellen gelassen, nach dem dreimaligem Waschen mit D-PBS wurde der FITC-gekoppelte Zweitantikörper in einer 1:200 Verdünnung in FACS-Medium auf die Zellen gegeben und wiederum 30-45 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit D-PBS, wurden die Zellen in 300µl D-PBS mit 1:1000 Propidiumiodid (PI: Endkonzentration 1 µg/ml) aufgenommen und im FACScan vermessen. Ausgewertet wurden ausschließlich die lebenden Zellen, die sich mit Propidiumiodid nicht anfärben ließen.

Zur FACS-Sortierung wurden die Zellen stets steril behandelt und nach der Resuspendierung in D-PBS/PI durch einen Filterdeckel in ein steriles Reagenzglas

getropft. Die Sortierung erfolgte entweder in ein weiteres Reagenzglas oder in 6-Loch-Gefäße mit vorgelegtem FCS.

### 4.3.3 Metabolische Assays

#### **<sup>35</sup>S-Methionin/Cystein-Markierung von Proteinen**

Es wurde ca. 1 mCi <sup>35</sup>S-Pro Mix (entspricht ca. 70 µl) pro 5x10<sup>6</sup> Zellen verwendet. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen und einmaligem Waschen mit warmen D-PBS wurden die Zellen 1 h bei 37 ° C in mit einer Zelldichte von 5x10<sup>6</sup> Zellen/ml in warmem RPMI ohne Methionin/Cystein inkubiert. Bei längeren Markierungen (für TAP) wurde anschließend 1 h mit Pro-Mix inkubiert, bei kürzen Puls-Markierungen (für MHC-Klasse-I-Moleküle) ca. 10 Minuten. Für Puls-Chase-Versuche wurde die Markierung gestoppt, indem abzentrifugiert, warmes Vollmedium hinzugegeben und weiter bei 37 ° C inkubiert wurde. Zum Stoppen des Chase wurden die Zellen bei 2000 Upm für 2 Minuten abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Nach dem Waschen mit D-PBS wurden die Zellen lysiert.

#### **Halbwertszeitbestimmung von MHC-Klasse-I-Molekülen**

##### Bestimmung durch metabolische Markierung

Es wurde eine metabolische Markierung mit <sup>35</sup>S-Promix durchgeführt. Dabei wurden Chase-Zeitpunkte gewählt, die länger als 1 Stunde lagen. Anschließend wurden NP40-Lysate mit W6/32-Beads präzipitiert. Das Präzipitat wurde mit Endo H verdaut und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach der Visualisierung der Banden, wurde der Film eingescannt und die Banden mittels Lumi-Analyst-Software quantifiziert.

##### Bestimmung durch FACS-Färbung

Zur Bestimmung der Halbwertszeit von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zelloberfläche wurde das Reagenz Brefeldin A verwendet. Es zerstört das Netzwerk des cis-Golgi-Apparates und verhindert so den Export von neu synthetisierten Klasse-I-Molekülen (Nuchtern et al., 1989). Der Inhibitor (Stammlösung: 1mg/ml in Isopropanol) wurde in einer Konzentration von 20µg/ml Lösung in Methanol auf 10<sup>6</sup> Zellen/ml gegeben und bei

37° C in Vollmedium inkubiert. Nach bestimmten Zeitpunkten wurden Aliquots von  $5 \times 10^5$  Zellen abzentrifugiert, einmal mit D-PBS gewaschen und auf Eis gestellt. Zu diesen Zeitpunkten wurde das Medium stets mit 20µg/ml BFA erneuert. Wenn alle Proben genommen waren, wurde eine FACS-Färbung angesetzt.

## **Nachweis der Peptidbeladung von MHC-Klasse-I Molekülen**

### Bestimmung durch FACS-Färbung

Durch die Verwendung der Proteaseinhibitoren Lactacystin oder LLnL wurde die Peptidbeladung von Klasse I Molekülen gestoppt. Es wurden pro Ansatz  $2 \times 10^6$ /ml Zellen mit 100 µM Lactacystin oder 100 µM LLnL in DMSO versetzt und 2h lang in Vollmedium bei 37° C inkubiert. Es wurden behandelte und kontroll-unbehandelte Zellen durch FACS-Färbungen analysiert.

### Bestimmung durch metabolische Markierung

Es wurden pro Ansatz  $2 \times 10^6$ /ml Zellen mit 100 µM Lactacystin (Stammlösung: 20mM) in DMSO versetzt und 2h lang in Vollmedium bei 37° C inkubiert. In Anwesenheit des Inhibitors wurde eine metabolische Markierung mit  $^{35}\text{S}$ -Promix durchgeführt, wobei bei kürzeren Markierungen erst eine Vorinkubation mit Inhibitor erfolgte. Anschließend wurden NP40-Lysate hergestellt und mit W6/32-Beads die Klasse I Moleküle präzipitiert. Das Präzipitat wurde mit Endo H verdaut und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach der Visualisierung der Banden, wurde der Film eingescannt und die Banden mittels Lumi-Analyst-Software quantifiziert.

### **Peptidbeladung auf Zellen**

Es wurden pro Ansatz  $5 \times 10^5$  Zellen eingesetzt, die mit 100 µM Peptid (Stamm: 1mg/ml in PBS) beladen wurden. Dazu wurden die Zellen in 500µl D-PBS mit 0,1 % Natriumazid aufgenommen und 2h bei Raumtemperatur mit der Peptidlösung rotiert. Zur Auswertung der Beladung wurde eine FACS-Färbung durchgeführt.